



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

ALINE GUIMARÃES SANTANA

**Identificação de possíveis alvos dos polissacarídeos
sulfatados sobre a cascata de coagulação e análises *in silico*
das interações**

Curitiba
2014

ALINE GUIMARÃES SANTANA

**Identificação de possíveis alvos dos polissacarídeos
sulfatados sobre a cascata de coagulação e análises *in silico*
das interações**

Monografia apresentada como
requisito para a disciplina TCC II
(Bmed006) no curso de graduação
em Biomedicina, Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal
do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Thales Ricardo
Cipriani

Co-orientadores: Dr^a Tatiana de
Arruda C.B. de Souza

Dr^a Ana Helena Pereira Gracher

Curitiba
2014

TERMO DE APROVAÇÃO

ALINE GUIMARÃES SANTANA

Identificação de possíveis alvos dos polissacarídeos sulfatados sobre a cascata de coagulação e análises *in silico* das interações

Monografia aprovada como requisito à disciplina TCC II (Bmed006) do Curso de Graduação em Biomedicina, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Orientador - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciência Biológicas/UFPR

Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducati

Membro convidado - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciência Biológicas/UFPR

Dr^a. Érika Izumi

Membro convidado - IBMP – Instituto de Biologia Molecular do Paraná

Agradecimentos

- Primeiramente a Deus, por tudo.
- A toda minha família, especialmente às minhas tias, sobrinhos e meus amados pais Jandira e Dalton, pelo apoio, incentivo, carinho e paciência, por todas as vezes que não pude estar presente nesses últimos anos, meu coração sempre está com vocês...
- Aos meus irmãos André, Marcelo, Júlio, Clayton, Rosana, Divino, Berthaline, Helga, Lavínia, Lilian, Dalton, Lidiani, Clautenis e Paola pela amizade e carinho.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Thales R. Cipriani pelos ensinamentos, ajuda e por ceder as amostras de CPS e AGS.
- Às minhas co-orientadoras Dr^a Tatiana A.C.B Souza e Dr^a Ana Helena Pereira Gracher, pelos ensinamentos, paciência, dedicação, gentileza e valiosa orientação.
- Ao Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin pelo apoio técnico.
- Ao Dr. Paulo Carvalho pela ajuda com as análises de MS.
- À Dr^a. Erika Izumi e seu esposo André pelo auxílio com o desenho da estrutura tridimensional de CPS.
- À banca avaliadora, Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani, Dr^a. Érika Izumi, e Prof. Dr. Diogo R.B. Ducatti.
- Aos meus colegas na FioCruz/PR, especialmente à Ana Valéria e à Stéphanie pela amizade e momentos de descontração.
- Aos meus colegas do grupo de química de carboidratos da UFPR, pela amizade em todo esses anos de convivência, especialmente, à Nadiezda, à Daiana, ao Larry e também ao Alex pela amizade e todo auxílio.
- Aos meus amigos pelo apoio, amizade e incentivo, especialmente Thaís, Jéssica, Juliano, Patrícia, Paula, Suelen, João, Lucas, Thiago e Yohana... Adoro vocês.
- Ao Fabian Czajkowski pela ajuda com o computador
- À FioCruz/PR e à UFPR.
- Aos órgão de fomento, CNPq, Fundação Araucária e ao PROBEM.

Índice

1. Introdução.....	10
2.Revisão Bibliográfica.....	11
2.1 Mecanismo de coagulação sanguínea e regulação.....	11
2.2 Heparina.....	13
2.3 Polissacarídeos sulfatados.....	15
2.3.1Pectina Cítrica sulfatada (CPS).....	16
2.3.2Arabinogalactana da soja (AGS).....	17
2.4 Fracionamento de componentes sanguíneos.....	19
2.4.1 Cromatografia de exclusão molecular.....	19
2.4.2 Cromatografia de troca iônica.....	21
2.5 Fluorimetria de varredura diferencial (<i>thermal shift</i>).....	22
2.6 Técnica para identificação de proteínas: espectrometria de massas.....	24
2.7 Análise <i>in silico</i>	26
3. Justificativa.....	27
4. Objetivos.....	27
4.1 Objetivo Geral.....	27
4.2 Objetivos Específicos.....	28
5. Metodologia.....	28
5.1 Obtenção dos polissacarídeos sulfatados CPS e AGS.....	28
5.2 Obtenção de proteínas do plasma e soro.....	28
5.3 Remoção da albumina presente no plasma e soro.....	29
5.4 Fracionamento dos componentes sanguíneos.....	29
5.5 Fluorimetria de varredura diferencial (<i>thermal shift</i>).....	30
5.6 Espectrometria de Massas.....	31
5.6.1 Aquisições por LC-MS/MS.....	31
5.6.2Análise dos dados brutos obtidos por MS.....	32
5.6.3Quantificação relativa de proteínas por MS.....	33
5.7 Análise <i>in silico</i>	34
5.7.1 Modelagem molecular.....	34

5.7.2 <i>Docking</i> molecular.....	34
5.7.3 Determinação <i>in silico</i> da energia de ligação.....	34
6. Resultados	35
6.1 Remoção da albumina do plasma e do soro.....	35
6.2 Fracionamento dos componentes sanguíneos.....	37
6.2.1 Fracionamento de proteínas do plasma.....	37
6.2.2 Fracionamento de proteínas do soro.....	41
6.3 Identificação de proteínas que interagem com CPS e AGS por <i>thermal shift</i> e MS.....	43
6.3.1 Proteínas plasmáticas.....	43
6.3.2 Proteínas do soro.....	46
6.4 Análise em <i>in silico</i> por <i>docking</i> molecular.....	47
7. Discussões.....	54
7.1 Remoção da Albumina do plasma e do soro.....	54
7.2 Fracionamento dos componetes sanguíneos.....	55
7.3 Identificação de proteínas que interagem com CPS e AGS por <i>thermal shift</i> e MS.....	57
8. Conclusões.....	60
9. Perspectivas.....	61
10. Referências.....	61
Anexo I.....	72

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática dos complexos procoagulantes.....	12
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de coagulação sanguínea.....	13
Figura 3. Sequência pentassacarídica específica da heparina que favorece a ligação da antitrombina a trombina e ao fator Xa.....	14
Figura 4. Representação esquemática da estrutura da pectina cítrica sulfatada (CPS).....	17
Figura 5. Representação esquemática da estrutura da arabinogalactana sulfatada (AGS).....	18
Figura 6. Mecanismo de separação por SEC.....	20
Figura 7. Exemplo de cromatograma de proteínas.....	21
Figura 8. Mecanismo de separação por SEC.....	22
Figura 9. Exemplo esquemático da técnica de <i>thermal shift</i>	24
Figura 10. Exemplo da curva sigmoideal referente ao teste de <i>thermal shift</i>	24
Figura 11. Representação esquemática de um espectrômetro de massas orbitrap.....	26
Figura 12. Análise dos resultados de remoção de albumina do plasma.....	36
Figura 13. Análise dos resultados de remoção de albumina do soro.....	36
Figura 14. Fracionamento das proteínas do plasma por SEC.....	38
Figura 15. Fracionamento das proteínas do plasma por troca catiônica.....	39
Figura 16. Fracionamento das proteínas do plasma por troca aniônica.....	40
Figura 17. Fracionamento das proteínas do soro por troca catiônica.....	41
Figura 18. Fracionamento das proteínas do soro por troca aniônica.....	42
Figura 19. Representação gráfica das amostras plasmáticas que adquiriram estabilidade térmica nos ensaios de <i>thermal shift</i>	44
Figura 20. Representação gráfica das amostras plasmáticas que adquiriram estabilidade térmica nos ensaios de <i>thermal shift</i>	47

Figura 21. <i>Docking</i> molecular do angiotensinogênio humano (PDB 2WXW) interagindo com CPS.....	49
Figura 22. <i>Docking</i> molecular do cofator II da heparina (PDB 1JMJ) interagindo com CPS.....	50
Figura 23. <i>Docking</i> molecular do fator B do complemento (PDB 2OK5) interagindo com CPS.....	51
Figura 24. <i>Docking</i> molecular do fator plaquetário 4 (PDB 1F9Q) interagindo com CPS.....	52
Figura 25. <i>Docking</i> molecular do zimogênio da protease C1r do complemento (PDB 1MD7).....	53
Figura 26. Representação esquemática da situação 1.....	56
Figura 27. Representação esquemática da situação 2.....	56

Índice de Tabelas

Tabela I. Prováveis parceiros plasmáticos de CPS e AGS identificados por MS/MS.....	46
Tabela II. Energia total de interação para cada um dos prováveis parceiros plasmáticos de CPS identificados por análises realizadas no <i>software</i> PEARLS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Doenças relacionadas ao sistema circulatório causam uma alta taxa de mortalidade, sendo que nos Estados Unidos, por exemplo, distúrbios cardiovasculares associados à trombose, são as principais causas de morte (NADER *et al.*, 2001). Mesmo quando não levam a vítima a óbito, as doenças cardiovasculares, frequentemente, causam algum grau de invalidez, gerando graves consequências tanto ao paciente e familiares, quanto ao âmbito sócio-econômico (ROCHA *et al.*, 2004).

Além de fatores de ordem genética, existem fatores ambientais e comportamentais que estão intimamente ligados ao surgimento dos distúrbios de hipercoagulabilidade vascular, sendo que nos últimos anos, o número de pessoas afetadas mundialmente vem aumentando consideravelmente (ROCHA *et al.*, 2004). Em decorrência desse fato, observou-se a necessidade da busca de novos agentes terapêuticos como alternativa ao tratamento à base de heparina, que apesar de ser largamente utilizado, apresenta graves efeitos adversos (PERRINAUD *et al.*, 2006). Uma das principais frentes de pesquisa busca por polissacarídeos de fungos ou vegetais, quimicamente sulfatados, que apresentem atividade anticoagulante (MULLOY *et al.*, 2000).

A heparina é um polissacarídeo sulfatado de origem animal que apresenta uma excelente atividade anticoagulante, sendo que, sua estrutura permite a interação com vários sítios, inibindo intensamente a cascata de coagulação por mais de uma via (NADER *et al.*, 2001). Entretanto, ela apresenta vários efeitos colaterais, decorrentes do seu baixo índice terapêutico e interações inespecíficas (NADER *et al.*, 2001). A posição e distribuição de ésteres de sulfato ao longo da cadeia, além da composição monossacarídica, tipo de ligação e estereoquímica, determinam como é a atividade de um polissacarídeo sulfatado sobre a coagulação (MAAS *et al.*, 2012). Portanto, para que um polissacarídeo seja um eficaz substituto à heparina, busca-se não somente a atividade anticoagulante, mas também sua ação seletiva, a fim de facilitar o controle da ação farmacológica no organismo do paciente.

Na atualidade foram encontrados inúmeros polissacarídeos de fungos e vegetais que após sulfatação química adquiriram variadas intensidades de ação sobre a inibição do processo de coagulação (DOCTOR & SAULS, 1983; ALBAN, *et al.*, 2002; PEREIRA, *et al.*, 2005; GRACHER, *et al.*, 2010; CHEN, *et al.*, 2012). Esse trabalho propõe compreender como dois polissacarídeos de origem vegetal (uma arabinogalactana extraída da soja e uma pectina cítrica extraída da laranja, ambos quimicamente sulfatados) agem no processo de inibição da cascata de coagulação, buscando por moléculas presentes no sangue que são capazes de interagir, e/ou reagir com os mesmos. A relevância desse estudo está exatamente em fornecer indícios sobre o mecanismo de ação anticoagulante de polissacarídeos quimicamente sulfatados, a fim de servir de base para pesquisas futuras, possibilitando propor alterações químicas em tais compostos que visem melhorar sua seletividade, assim como prever com mais precisão sua ação quando administrados a um paciente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MECANISMO DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA E REGULAÇÃO

O mecanismo de coagulação sanguínea trata-se de um processo fisiológico essencial e altamente regulado (FRANCO, 2001; GRACHER, 2010). A formação de um coágulo de fibrina em uma região lesionada do endotélio deve impedir um processo hemorrágico e fornecer tempo para que ocorra o reparo da lesão, sem gerar, no entanto, formação excessiva de trombos que possam ocluir a circulação sanguínea causando isquemias (COLMAN, 2006).

O processo de coagulação sanguínea ocorre por meio da ativação proteolítica de zimógenos por proteases plasmáticas, o que culmina na formação de uma rede de fibrina que possibilita a formação do coágulo (MACFARLANE, 1964; DAVIE & RATNOFF, 1994;). Independentemente do fator desencadeante, a coagulação depende da expressão e exposição no espaço intravascular, de um componente crítico, o fator tecidual (FT). Na atualidade, o mais aceito é que os mecanismos hemostáticos fisiologicamente importantes estão associados a três complexos enzimáticos procoagulantes,

que envolvem serinoproteases dependentes de vitamina K (fatores II, VII, IX e X) que se associam aos cofatores (V e VIII) (JENNY & MANN, 1998). As enzimas que fazem parte da cascata de coagulação, quando ativadas, convertem zimogênios em enzimas proteoliticamente clivadas e ativas, as quais são necessárias para ativar outras enzimas da cascata. Este processo ocorre sobre membranas de plaquetas ativadas, que contém em sua superfície externa fosfolipídeos negativamente carregados (Figura 1) (JANNY & MANN, 1998; COLMAN *et al.*, 2001; FRANCO, 2001).

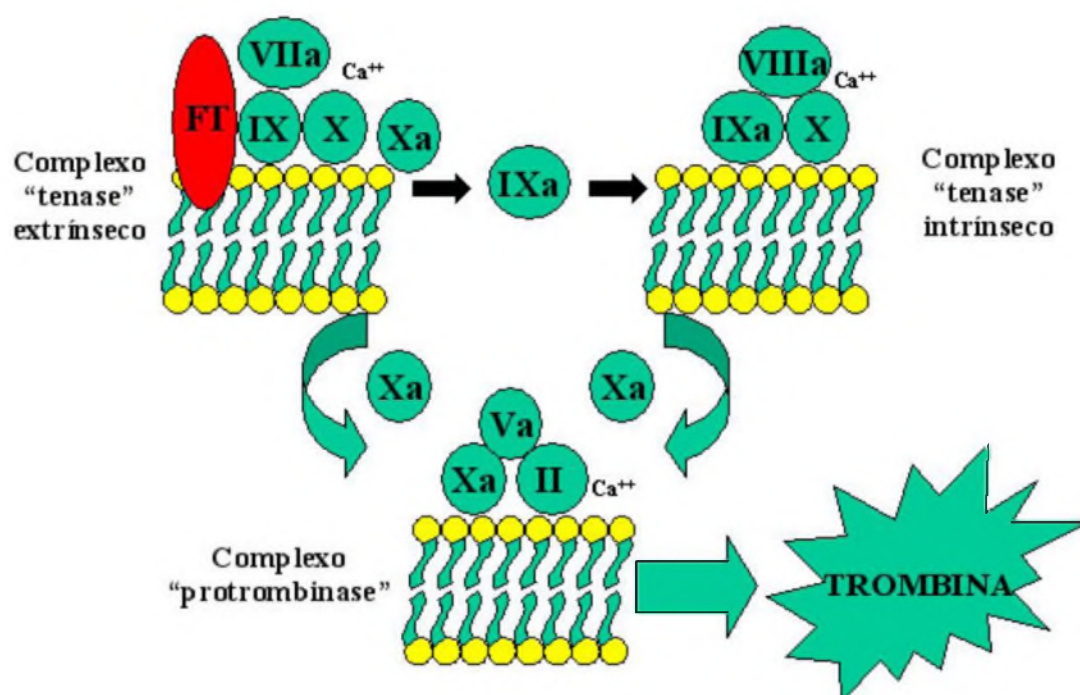


FIGURA 1 –Representação esquemática dos complexos procoagulantes. Início mediante a ligação do fator VIIa ao fator tecidual (FT), com subsequente ativação dos fatores IX e X. O complexo fator IXa/fator VIIIa ativa o fator X com eficiência ainda maior, e o fator Xa forma complexo com o fator Va, convertendo o fator II (protrombina) em fator IIa (trombina). A superfície de membrana celular plaquetária em que as reações ocorrem também encontra-se representada. Fonte: Extraído de FRANCO, 2001.

Em nível mais detalhado, a cascata de coagulação tem início, quando o FT interage com o fator VII ativo (VIIa) (indivíduos normais apresentam aproximadamente 1% da concentração plasmática de fator VII na sua forma ativa) (FRANCO, 2001). O complexo FVIIa-FT apresenta atividade enzimática, e promove a ativação de mais fator VII, num processo denominado “auto-ativação”. Além disso, esse complexo também é capaz de promover a ativação

dos fatores IX e X por clivagem proteolítica. Na presença de Ca^{++} , o fator IX ativo (IXa) interage com o fator VIII ativo (VIIIa), formando um complexo capaz de ativar mais fator X. O fator X ativo (Xa), por sua vez, na presença de Ca^{++} , também forma um complexo enzimático com o fator V ativo (Va) e converte protrombina (fator II) em trombina que promove a quebra do fibrinogênio, dando origem à fibrina, sendo que essa última é a proteína responsável por formar a malha que dá origem ao coágulo. Além da formação de fibrina, a trombina também é capaz de ativar os fatores V, VIII e XI, sendo ainda que, o fator XI ativo além de apresentar capacidade de auto-ativação na presença de Ca^{++} , também promove clivagem proteolítica do fator IX, ativando-o (FRANCO, 2001). A figura abaixo (Figura 2) representa de forma esquemática o mecanismo do processo de coagulação explicado nesse parágrafo.

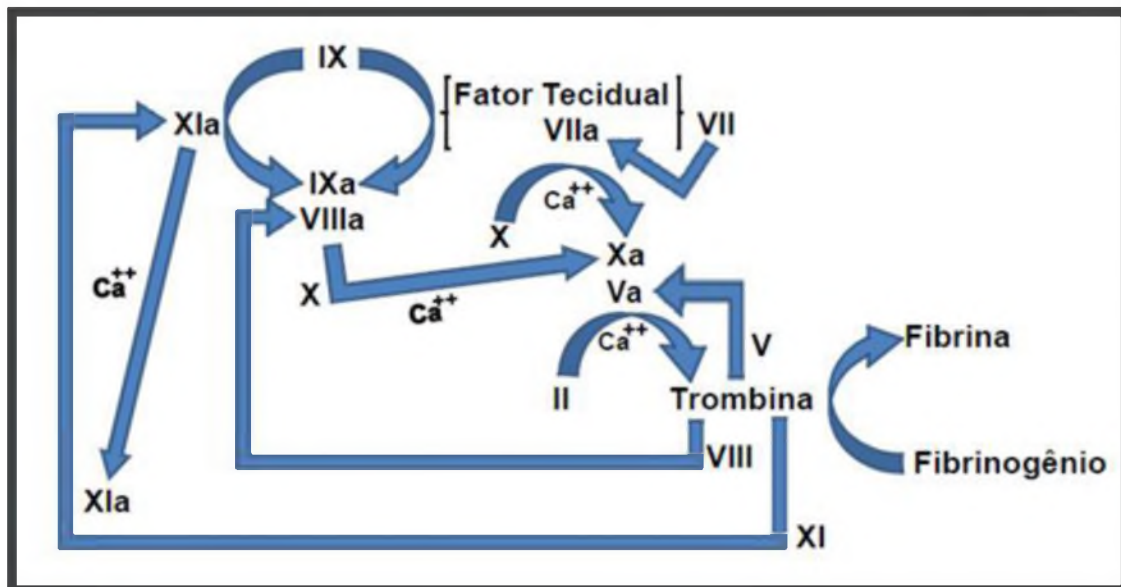


FIGURA 2 – Representação esquemática do mecanismo de coagulação sanguínea. As diferentes reações ocorrem na superfície da membrana de plaquetas ativadas, que contêm fosfolípidos negativamente carregados (não representadas no esquema). Fonte: Adaptado de FRANCO, 2001.

2.2 HEPARINA

A heparina é um polissacarídeo linear de origem animal altamente sulfatado pertencente à família dos glicosaminoglicanos. Ela é constituída por unidades dissacarídicas de α -D-glucosamina e ácido urônico, unidas por ligações α -glicosídicas 1→4 (CASU *et al.*, 2014). Desde a sua descoberta, a

heparina é um dos medicamentos mais utilizados em distúrbios de pró-coagulação (PROST, 1986; WALENGA *et al.*, 2003; STEVEN & GOLDBABER, 2006). Seu efeito é indireto, uma vez que para inibir a cascata de coagulação, necessita da presença da antitrombina (AT) ou do cofator II da heparina (HCII). Esse mecanismo fundamenta-se no fato da heparina facilitar a ligação entre a trombina e a AT ou ao HCII, atuando como um molde na formação do complexo ternário, além de também favorecer a ligação da AT ao fator Xa (GRACHER, 2010). Estudos apontam que uma sequência pentassacarídica específica (Figura 3), é a responsável pela ligação à antitrombina (LINDAHL *et al.*, 1979; RAGAZZI *et al.*, 1990). Todavia, acredita-se que a inibição pelo HCII não necessita de uma sequência oligossacarídica específica, estando relacionada apenas às cargas negativas dos grupos sulfato (SIÈ *et al.*, 1989).

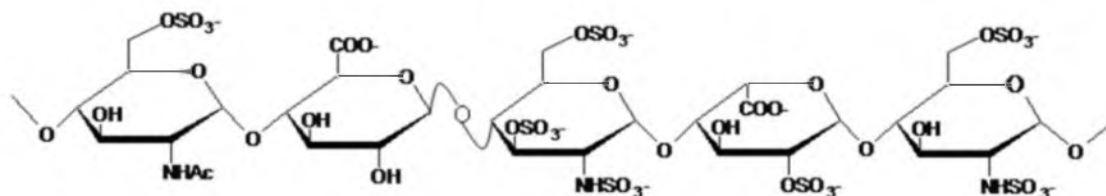


FIGURA 3 – Sequência pentassacarídica específica da heparina que favorece a ligação da antitrombina à trombina e ao fator Xa. Extraído de GRACHER, 2010.

Apesar de amplamente utilizada na clínica, a heparina apresenta inúmeros inconvenientes, como, o risco de contaminação por patógenos, devido ao fato de ser obtida de fonte animal. O seu uso também pode causar problemas como hemorragias, trombocitopenias, além de hematomas, dermatite de contato, urticárias e necrose do tecido epitelial em função da sua administração (JUERGENS *et al.*, 1997; WALENGA *et al.*, 2003; PERRINAUD *et al.*, 2006; SCHINDEWOLF *et al.*, 2012; JUNQUEIRA *et al.*, 2013). Devido a tais inconvenientes, existe uma grande busca por compostos alternativos à heparina, sendo que, as análises de outros polissacarídeos quimicamente ou naturalmente sulfatados têm mostrado resultados bastante promissores (ALBAN *et al.*, 1995; MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2008; GRACHER *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012).

2.3 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Polissacarídeos sulfatados (PS) são polímeros formados por monômeros de carboidratos, que apresentam em sua estrutura uma quantidade variável de radicais sulfato (RODRIGUES & FARIAS, 2009; VITORINO, 2011). Estes, tratam-se de macromoléculas complexas e heterogêneas que se encontram amplamente distribuídas na natureza, sendo encontrados em animais (BURSON *et al.*, 1956; MATHEWS, 1975; MOURÃO & PEREIRA, 1999; SOUZA *et al.*, 2007) e especialmente em algas marinhas (PAINTER, 1983; PERCIVAL & McDOWELL, 1967; ALBAN *et al.*, 2002; ROCHA, *et al.*, 2004; AQUINO *et al.*, 2005). Nas algas marinhas pardas (*Phaeophyceae*), vermelhas (*Rhodophyceae*) e verdes (*Chlorophyceae*), os principais PS encontrados, estão respectivamente na forma de fucanas, galactanas e arabinogalactanas (PERCIVAL & McDOWELL, 1967). Nos vertebrados, são conhecidos PS que se apresentam na forma de glicosaminoglicanos ou proteoglicanos, sendo que dentre estes podemos destacar condroitim, heparam, queratam e dermatam sulfato, e também a heparina (KJELLÉN & LINDAHL, 1991). Não se sabe muito a respeito das funções fisiológicas desses polissacarídeos sulfatados, entretanto, estudos apontam que nas algas estão relacionados ao controle mecânico, osmótico e iônico (PAINTER, 1983; KLOAREG & QUATRANO, 1998), além de atuarem em mecanismos de defesas desses organismos, relacionados a agressões ambientais por metais pesados (ANDRADE *et al.*, 2010). Nos organismos animais, acredita-se que a função fisiológica dos polissacarídeos sulfatados está relacionada ao sistema imunológico, sinalização celular (KOLLER, 1975) e também à regulação da hemostasia (DAMUS *et al.*, 1973; HAJ MOHAMMADI *et al.*, 2003).

Sabe-se que além das atividades fisiológicas desempenhadas no organismo de origem, polissacarídeos sulfatados, podem desempenhar uma variedade de funções biológicas, tais como, atividade imunoestimulante (RODRIGUES, 2006; LIMA, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008); antiviral (DAMONTE *et al.*, 1994; SINHA *et al.*, 2010), antibacteriana (NAIR; *et al.*, 2007; VENKATESWARLU *et al.*, 2007), antinociceptiva (VIANA *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2004;), antitumoral (ZHOU *et al.*, 2004; LINS, *et al.*, 2009), antiangiogênica (LINHARDT & TOIDA *apud* WITEZAK; NIEFORTH, 1997;

CUMASHI *et al.*, 2007), antimetastática (ZACHARSKI& ORNSTEIN, 1998), antioxidante (HU *et al.*, 2010), anti-hiperlipidêmica (PENGZHAN *et al.*, 2003), antiaterosclerótica (ENGELBERG, 1991) e mais conhecidamente anticoagulante (ATHUKORALA *et al.*, 2007; FARIAS *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2008) e antitrombótica (FARIAS *et al.*, 2001), etc.

Estudos têm mostrado que homopolissacarídeos sulfatados como glucanas, fucanas, galactanas, ramnanas, entre outros e heteropolissacarídeos sulfatados, como arabinogalactanas, manogalactanas; xiloarabinogalactanas entre outros, apresentam variadas intensidades de ação sobre a hemostasia (ALBAN, *et al.*, 1995; MOURÃO & PEREIRA, 1999; MATSUBARA, *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2002; MELLO, *et al.*, 2008; GRACHER *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012; QI *et al.*, 2012; VASCONCELOS *et al.*, 2013; GÓMEZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2014). No geral, a ação anticoagulante de polissacarídeos sulfatados, assim como da heparina, se dá por meio da potencialização da ação de inibidores naturais da cascata de coagulação, como a AT e o HCII (POMIN, 2009). Porém, vários estudos têm apontado que em diversos casos a inibição pode ocorrer por outros mecanismos, como inibição direta das proteases ou por interação com outros componentes da cascata de coagulação (POMIN, 2009).

Polissacarídeos sulfatados podem ser obtidos de fontes naturais (principalmente algas) ou por processo de sulfatação química. Além da estrutura e massa molar, o grupo sulfato é fundamental para a atividade anticoagulante de polissacarídeos (GRACHER, 2010). Neste trabalho, os polissacarídeos a serem estudados são uma pectina cítrica (CPS) extraída da laranja e uma arabinogalactana da soja (AGS), ambos quimicamente sulfatados.

2.3.1 Pectina cítrica sulfatada (CPS)

A pectina cítrica trata-se de um polissacarídeo extraído do mesocarpo de *Citrus sinensis* (laranja). Para sua obtenção, Mass *et al.* (2012), submeteram o mesocarpo de laranja seco e moído à processo de extração com 0,01 M de HCl por 1 hora, seguido por filtração. Utilizando NaOH, a solução foi neutralizada,

sendo logo após dialisada e liofilizada para obtenção da pectina. Após a liofilização, a pectina passou por sulfatação química de acordo com o método de O'Neill (1955) (MAAS *et al.*, 2012). A composição monossacarídica da pectina foi determinada por análises dos derivados alditóis acetato por CG-MS e análise de ácidos urônicos por cromatografia em camada delgada e quantificação colorimétrica (MAAS *et al.*, 2012). A posição dos grupos sulfato no polissacarídeo foi determinada por análise de metilação. Sua estrutura nativa é composta quase unicamente de unidades repetidas de α -D-GalpA (1 \rightarrow 4) ligadas, embora também apresente vestígios de açúcares neutros: galactose (1,8%), glucose (1,5%), arabinose (0,8%) e ramnose (0,4%) (MAAS *et al.*, 2012). Após a sulfatação, a pectina passou a apresentar grupos sulfato em algumas unidades de GalpA, nas posições O-2 e/ou O-3 (Figura 4) (MAAS *et al.*, 2012).

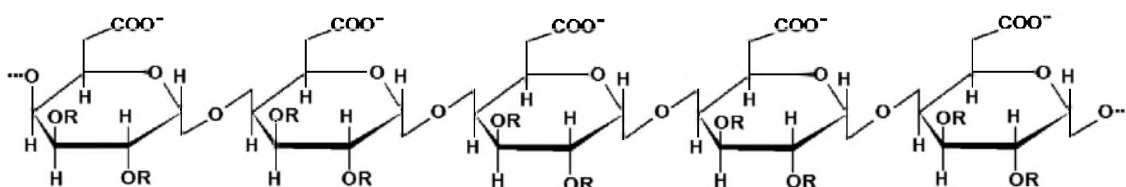


FIGURA 4 – Representação esquemática da estrutura da pectina cítrica sulfatada (CPS). R = H ou $-\text{SO}_3^{2-}$

Um estudo realizado por Maas *et al.*, publicado em 2012, investigou a atividade do polissacarídeo quimicamente sulfatado (CPS) sobre a coagulação. Foi verificado por testes *in vitro* de aPTT (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada) que CPS apresenta um efeito anticoagulante.

2.3.2 Arabinogalactana da soja sulfatada (AGS)

A arabinogalactana da soja (AG) é um heteropolissacarídeo extraído de farelo de soja (grão deslipidificado e moído). A extração foi realizada em solução aquosa, com posterior precipitação etanólica (CIPRIANI *et al.*, 2009). O precipitado etanólico foi solubilizado em água destilada e para remoção de contaminantes protéicos foi adicionado ácido tri-cloroacético (TCA) para uma concentração final de 10%. Em seguida, a fração solúvel em TCA foi neutralizada com NaOH, dialisada e liofilizada. Após, o material foi dissolvido em água e submetido ao processo de fracionamento por congelamento e

degelo. A fração solúvel em água fria foi, então, dialisada em membrana com limite de exclusão de 100 kDa e, a fração retida na diálise apresentou o polissacarídeo purificado AG (CIPRIANI *et al.*, 2009). A estrutura do polissacarídeo foi determinada por análises de composição monossacarídica, de metilação, e RMN. Os resultados mostraram que AG é constituída por uma cadeia principal de unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 4) ligadas, substituídas em O-3 por cadeias laterais de α -L-Araf (1 \rightarrow 5) ligadas, as quais podem ser substituídas em O-2 ou O-3 por terminais não redutores de α -L-Araf (Figura 5) (CIPRIANI *et al.*, 2009).

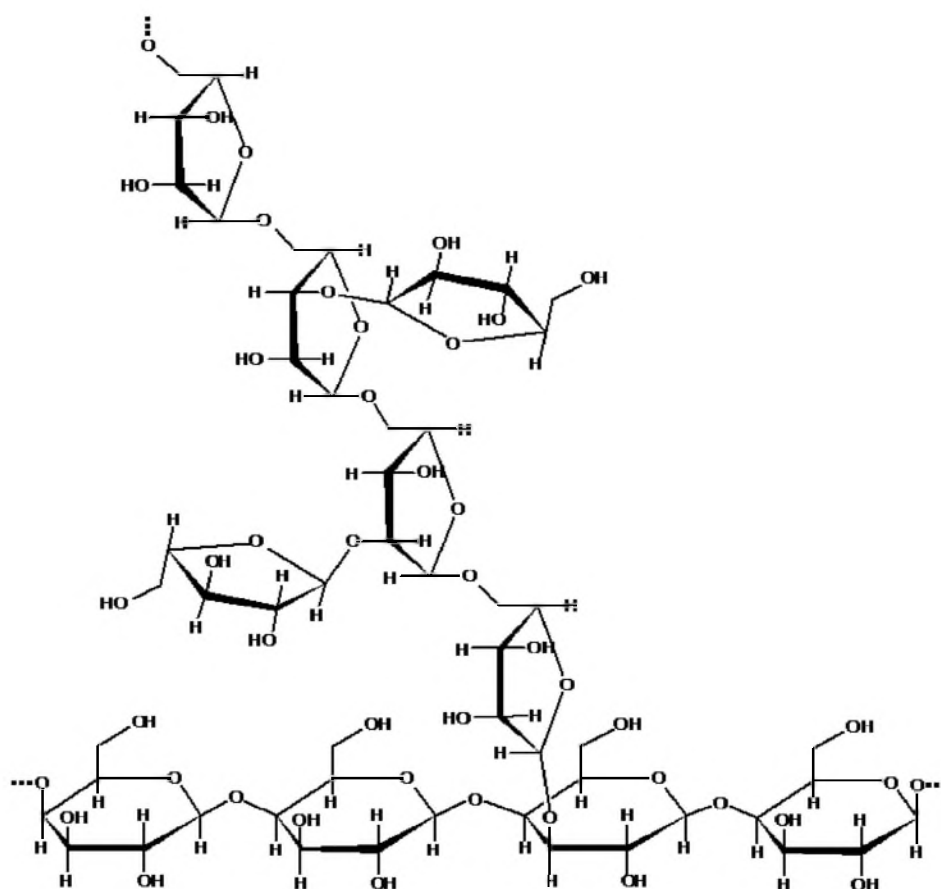


FIGURA 5 – Representação esquemática da estrutura da arabinogalactana nativa (AG).

Estudos não publicados investigaram a atividade desse polissacarídeo sobre a coagulação após sulfatação química. Foi verificado por testes de aPTT que a arabinogalactana quimicamente sulfatada (AGS) apresenta um alto efeito anticoagulante *in vitro*.

2.4 FRACIONAMENTO DE COMPONENTES SANGUÍNEOS

Inventada em 1906 pelo botânico russo Mikhail Semenovitch Tswett e bastante utilizada até os dias atuais, a técnica de cromatografia é um método físico-químico de separação e purificação de moléculas (DEGANI *et al.*, 1998; DIAS, 2010). Esta técnica fundamenta-se na eluição diferencial de compostos através de uma fase estacionária, em função da diferente interação das moléculas à fase estacionária (fase fixa) e à fase móvel (fase que fica em constante fluxo e possibilita a eluição dos compostos) (DEGANI *et al.*, 1998). Existem diversos tipos de cromatografias específicas para diferentes categorias de compostos a serem analisados e purificados. Por exemplo, a cromatografia gasosa (GC) é específica para gases e compostos voláteis; a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é utilizada para compostos orgânicos diversos; a cromatografia de troca iônica (IEX) é útil na separação de compostos iônicos ou ionizáveis; a cromatografia de exclusão molecular (SEC) para a separação de macromoléculas por diferença de tamanho; a cromatografia quiral é importante na separação de isômeros ópticos; etc (DIAS, 2010). Dentre as diferentes técnicas citadas, duas foram utilizadas nesse trabalho, a cromatografia de exclusão molecular (SEC) e a cromatografia de troca iônica (IEX) que estão descritas mais detalhadamente a seguir. Esses dois métodos cromatográficos foram escolhidos para fracionar o plasma e soro em alíquotas compostas de diferentes proteínas. Essa etapa foi fundamental para possibilitar a identificação de proteínas que interagem com os compostos AGS e CPS.

2.4.1 Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular (SEC, *Size Exclusion Chromatography*), também conhecida como cromatografia de permeação em gel (GPC, *Gel Permeation Chromatography*) ou gel filtração, é uma técnica amplamente utilizada para a purificação e determinação do raio hidrodinâmico de polímeros, copolímeros, nanopartículas e proteínas (MORI & BARTH, 1999). Esse método baseia-se na separação das partículas em função do seu tamanho e forma. Esse processo de separação ocorre em colunas empacotadas com material poroso (poros de vários tamanhos) como sílica gel, gel de poliestireno, grânulos de vidro, entre outros (MORI & BARTH, 1999).

Moléculas maiores tem maior dificuldade de difusão para o interior dos poros do gel e, portanto, são eluídas mais rapidamente pela fase móvel (solvente). Já as moléculas menores têm maior facilidade de penetrar nos poros do gel, fazendo dessa forma um trajeto mais longo pela coluna e, conseqüentemente, sendo eluídas mais tardiamente. Na figura 6, podemos observar um exemplo do mecanismo de separação por SEC.

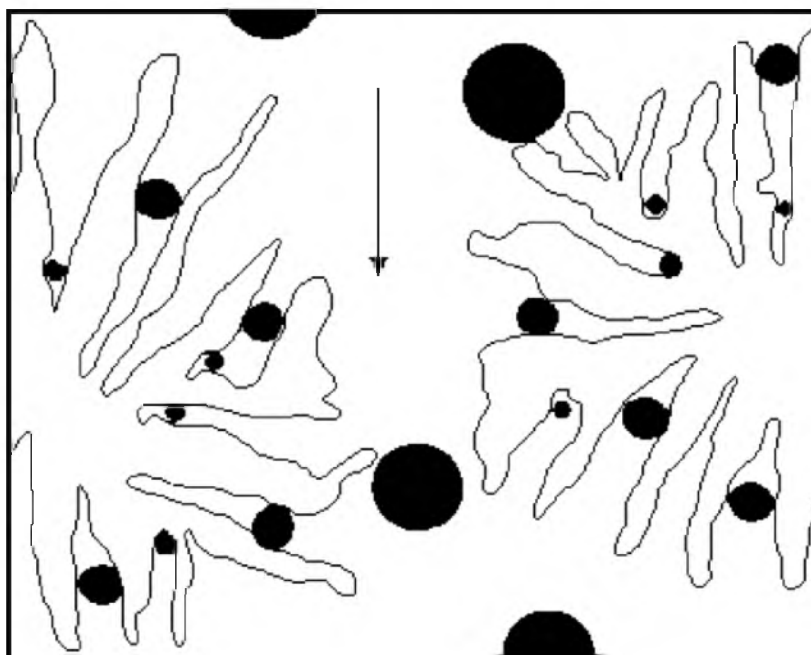


FIGURA 6 – Mecanismo de separação por SEC. Quanto maiores as moléculas, menor a interação com os poros e conseqüentemente mais rápida a eluição. Extraído de LUCAS, SOARES & MONTEIRO, 2001.

Para que seja possível determinar o volume de eluição (ou tempo de retenção) de cada população de partículas, a coluna de SEC deve estar acoplada a um aparelho que apresente um detector capaz de detectar as partículas no momento em que começam a ser eluídas (MORI & BARTH, 1999). Para a análise de proteínas, comumente a coluna está acoplada a um aparelho de FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*) que utiliza um detector UV e fornece um cromatograma mostrando o tempo de retenção ou volume de eluição de cada proteína através da absorbância do eluato (A280nm) que é captada pelo aparelho. Na figura 7 podemos ver um exemplo de cromatograma de proteínas.

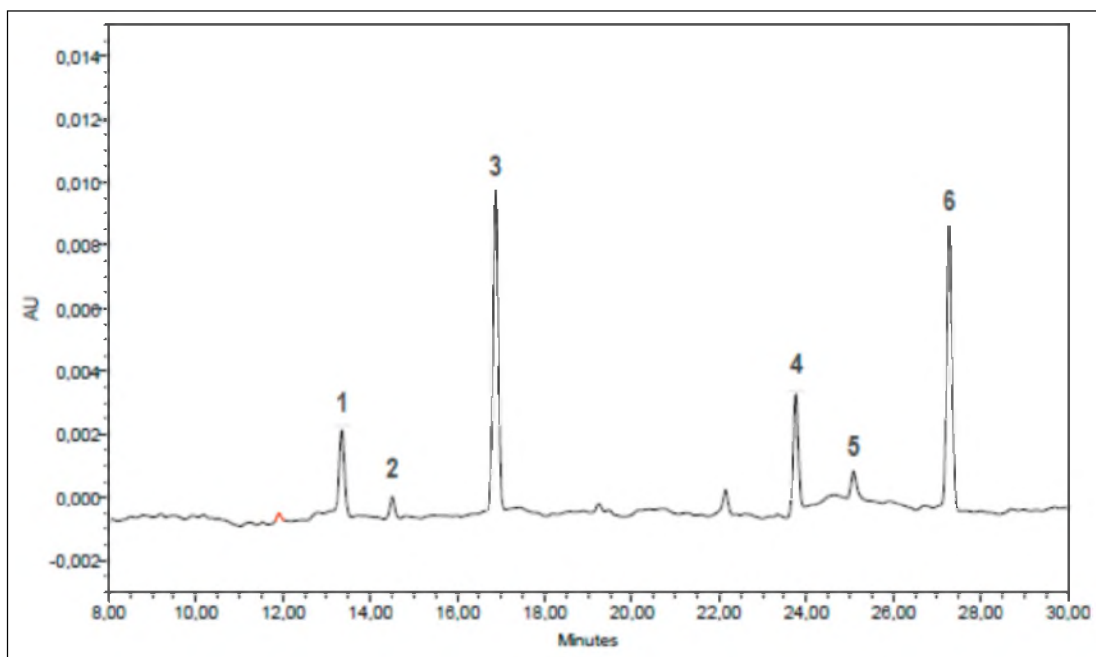


FIGURA 7 – Exemplo de cromatograma de proteínas. Cada sinal do cromatograma refere-se a uma determinada proteína, sendo que os sinais com menor tempo de eluição correspondem a proteínas maiores. Exemplo: a proteína referente ao sinal 1 é maior que a proteína referente ao sinal 2, assim como a referente ao sinal 3 e assim sucessivamente. Extraído de DAGUER, *et al.*, 2010.

2.4.2 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica (IEX, *Ion Exchange Chromatography*), é uma técnica bastante útil para a purificação de partículas iônicas ou ionizáveis, como por exemplo proteínas, que por se tratarem de moléculas anfóteras, podem apresentar carga positiva, negativa ou neutra, de acordo com pH da solução onde se encontrem (MENEGATTI, 2010).

O mecanismo desse tipo de cromatografia baseia-se na adsorção seletiva entre os solutos carregados e a fase estacionária, que nesse caso trata-se de uma matriz insolúvel constituída de material poroso e altamente carregada com sinal oposto (aniônica ou catiônica) (COLLINS *et al.*, 2006; DIAS, 2010). A eluição dos compostos adsorvidos se dá pela adição de íons à fase móvel, com a mesma carga dos compostos adsorvidos, em um gradiente crescente de concentração (Figura 8) (COLLINS *et al.*, 2006). Algo importante a se ressaltar é que existem diferentes tipos de matriz. Por exemplo, matrizes denominadas de trocadoras fortes (utilizadas em uma ampla faixa de pH) ou

fracas (utilizada em faixas restritas de pH) de íons, sendo que, a indicação da matriz a ser utilizada, depende do composto a ser purificado.

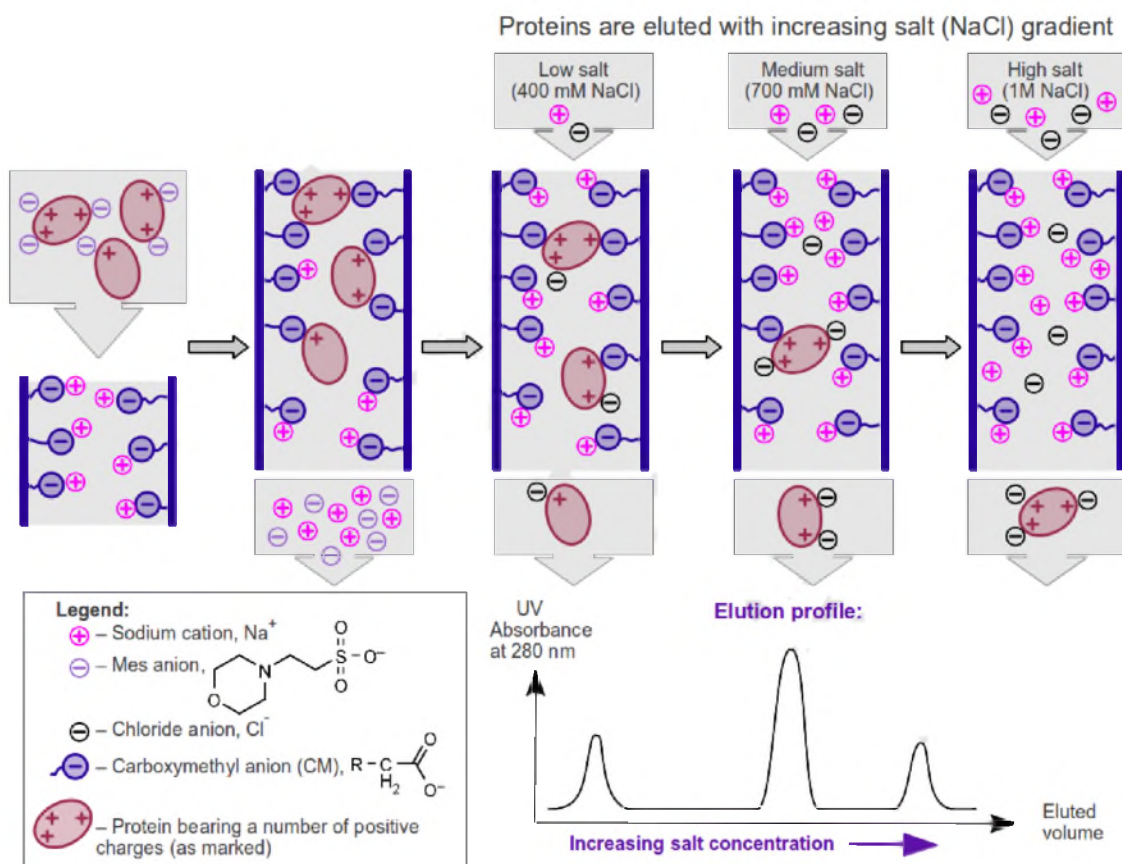


FIGURA 8 – Mecanismo de searação por IEX. As proteínas positivamente carregadas adsorvem na coluna negativamente carreda, e são eluídas com gradiente crescente de Na^+ . Extraído de <http://www.reachdevices.com/Protein/ProteinPurification.html>

2.5 FLUORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (*THERMAL SHIFT*)

Sabe-se que a estabilidade das proteínas está relacionada à sua energia livre de Gibbs durante a desnaturação (ΔG_u), que é temperatura-dependente. Desta maneira, quanto mais alta a temperatura, menor a estabilidade protéica ($\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$), assim, ΔG_u encontra-se igual a zero quando as concentrações da proteína em conformação e desnaturadas são iguais, sendo que, neste ponto encontra-se a temperatura de fusão (T_m , *melting temperature*) (BEADLE, *et al.*, 1999).

Quando um composto se liga a uma proteína, gera um aumento na energia livre do complexo, resultando consequentemente em um aumento da T_m . Todavia, a magnitude desse efeito estabilizador não está relacionada apenas à concentração e afinidade do composto pela proteína, mas também a contribuições entrópicas da ligação. Desta forma, podemos observar maiores mudança na T_m por ligações que alteram mais a entropia de um sistema (ex. interações hidrofóbicas) (PANTOLIANO *et al.*, 2001). Sendo ainda que, uma determinada mudança na T_m não é proporcional à afinidade das interações, uma vez que, diferentes componentes entrópicos, com diferentes afinidades podem originar uma mesma variação na T_m (PANTOLIANO *et al.*, 2001; NIESEN *et al.*, 2007)

Fluorimetria diferencial de varredura (*thermal shift*) é uma técnica rápida e barata, utilizada para identificação da interação de proteínas e seus ligantes, e tem como base, o monitoramento da desnaturação protéica em função da temperatura, na presença e ausência (controle negativo) de possíveis ligantes (PANTOLIANO *et al.*, 2001).

Para que seja possível monitorar a desnaturação das proteínas em função da temperatura, adiciona-se ao meio reacional um corante fluorescente (sonda) para monitorar a desnaturação protéica. A sonda que tem se mostrado mais favorável para este fim, é o *Sypro orange*, devido a sua alta relação sinal/ruído. Quando a proteína começa a sofrer desnaturação devido ao aumento de temperatura, este corante fluorescente se liga a resíduos hidrofóbicos que são expostos, e emite fluorescência que é captada pelo aparelho (Figura 9). Ao final do experimento têm-se uma curva sigmoidal da intensidade de fluorescência em função da temperatura, onde o ponto de inflexão da curva de transição representa a T_m (Figura 10). Algo importante a se ressaltar, é que para que o corante seja eficaz ele não deve emitir fluorescência quando livre no meio aquoso (PANTOLIANO *et al.*, 2001).

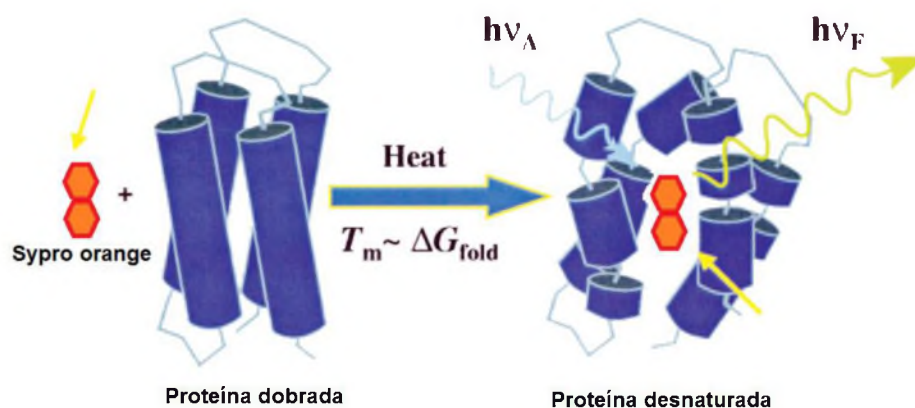


FIGURA 9 – Exemplo esquemático da técnica de *Thermal shift*. Após a proteína sofrer desnaturação pela temperatura, o corante fluorescente *sypro orange* se liga a resíduos hidrofóbicos expostos e passa a emitir fluorescência. Adaptado de PANTOLIANO *et al.*, 2001.

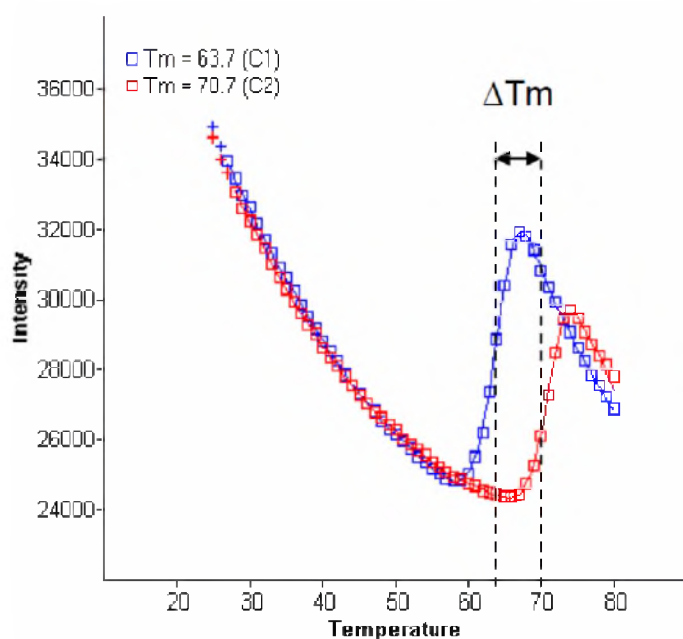


FIGURA 10 – Exemplo da curva sigmoideal referente ao teste de *thermal shift*. T_m representa a temperatura de fusão, onde 50% das proteínas do meio reacional se encontram desnaturadas. Fonte: http://www.beta-sheet.org/resources/T15-Maksel_Protein-Stability.pdf

2.6 TÉCNICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS: ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas (MS, *Mass Spectrometry*), é uma técnica de análise qualitativa e quantitativa, que consiste no estudo de íons em fase gasosa e possibilita a identificação da composição química de compostos isolados ou de diferentes compostos em misturas complexas (SOUZA, 2008; FIORAMONTE, 2012). Essa identificação ocorre pela determinação das massas moleculares dos analitos em função da movimentação destes através

de um campo elétrico, sendo ainda que, tal movimentação é determinada em função da razão massa/carga (m/z) do analito. É importante ressaltar que não é possível analisar moléculas ou átomos neutros por MS (ROMÃO, 2010).

Nos anos 70 começou a surgir um grande interesse da comunidade científica na utilização da MS para caracterização de biomoléculas (FIORAMONTE, 2012). Todavia, a limitação dessa ideia estava na geração de íons em fase gasosa a partir de macromoléculas. Somente no final dos anos 80, com o surgimento de técnicas de ionização suave como ESI (*Eletrospray Ionization* – FENN *et al.*, 1989) e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* – TANAKA *et al.*, 1985), foi possível utilizar MS para o estudo de biomoléculas como peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos (TANAKA *et al.*, 1985; FENN *et al.*, 1989). Com o surgimento dessas novas técnicas de ionização e com a evolução dos analisadores de massas, a MS para a análise de biomoléculas, especialmente proteínas evoluiu extensivamente. Atualmente a MS é largamente utilizada no estudo de proteínas e complexos protéicos, como por exemplo, na identificação, sequenciamento, determinação da massa molecular, quantificação, etc (FIORAMONTE, 2012).

A análise por espectrometria de massas, em geral ocorre em cinco etapas: (1º) injeção da amostra; (2º) ionização das moléculas (3º); separação dos íons formados em função da razão m/z pelo analisador de massas; (4º) contagem dos íons e transformação do sinal em corrente elétrica pelo detector; (5º) processamento e geração do espectro por meio da conversão do sinal elétrico em dados com base na magnitude do sinal e da razão m/z (ROMÃO, 2010). Na figura 11 temos uma representação esquemática do espectrômetro de massas *orbitrap*, utilizado para realizar as análises de MS nesse trabalho.

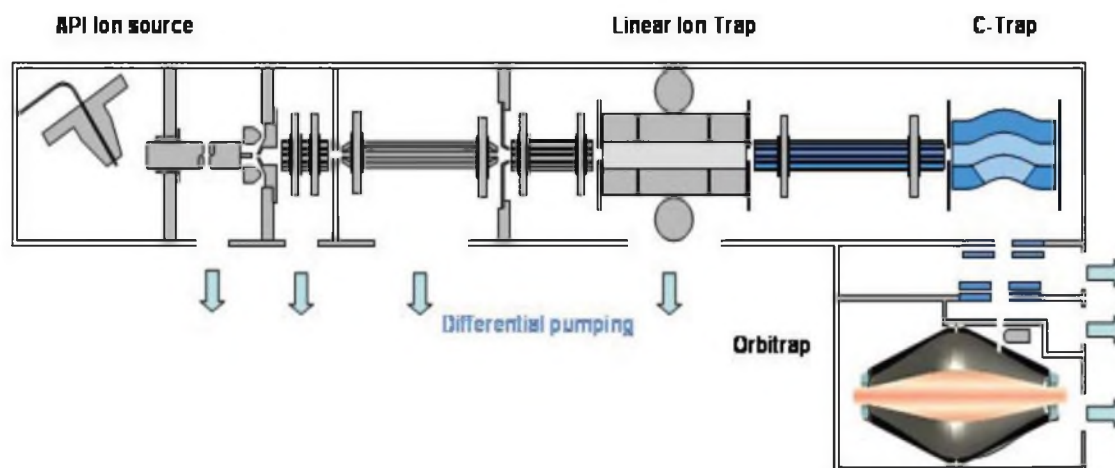


FIGURA 11 – Representação esquemática de um espectrômetro de massas orbitrap. Fonte: <http://departments.agri.huji.ac.il/zabam/orbitrap.html>.

2.7 ANÁLISE *IN SILICO*

Técnicas de bioinformática são atualmente muito utilizadas na análise e compreensão de processos bioquímicos e biofísicos (SANT'ANNA, 2009). Algoritmos capazes de realizar simulações de interação entre compostos podem ser utilizados como importantes ferramentas em etapas iniciais do planejamento racional de compostos bioativos, uma vez que, podem auxiliar na predição dos prováveis mecanismos de ação (BARREIRO & FRAGA, 2001). Esse tipo de análise tem sido de grande importância, tanto na pesquisa, como na indústria, em especial na indústria farmacêutica e biotecnológica, sendo que, a ação de moléculas bioativas, além de ser um processo de alta complexidade, pode muitas vezes, ter como determinante fundamental interações intermoleculares e/ou reações químicas com macromoléculas biológicas, especialmente proteínas (BARREIRO & FRAGA, 2001).

Para que essas interações e/ou reações ocorram deve haver uma complementariedade entre os compostos, o que permite o estabelecimento de interações mais ou menos específicas, como dipolo-dipolo e íon-íon, pontes de hidrogênio e forças de dispersão, que contribuem para a energia de interação entre o ligante e a macromolécula (SANT'ANNA, 2009). É especificamente nesse ponto em que a bioinformática pode contribuir, fornecendo uma descrição detalhada a respeito das estruturas dos compostos que estão

interagindo e/ou reagindo, e também das possibilidades de interações intermoleculares entre eles (SANT'ANNA, 2009).

Nesse trabalho, a interação proteína-ligante foi mimetizada pela técnica de *docking* molecular onde utilizou-se estruturas protéicas resolvidas por cristalografia de raios-X depositadas no protein data bank (PDB). As interações foram mapeadas e a predição da energia de interação proteína-ligante realizada.

3. JUSTIFICATIVA

Grande parte dos efeitos adversos da heparina estão no fato dela apresentar baixa biodisponibilidade, não interagindo apenas com enzimas envolvidas no processo de coagulação/anticoagulação. Idealmente, um composto alternativo a heparina além da atividade anticoagulante e antitrombótica, deve apresentar especificidade de ligação a componentes da cascata de coagulação, inibindo-a, fato que diminuiria os efeitos colaterais, além de facilitar seu controle no organismo do paciente. Os resultados desse trabalho irão guiar futuros estudos, pois conhecendo os potenciais alvos moleculares de CPS e AGS é possível começar a delinear estratégias mais específicas para compreensão de seu mecanismo de ação. Além disso, o conhecimento das bases moleculares da interação alvo-CPS/AGS direcionará estudos de modificações nesses compostos que visem aumentar sua especificidade.

A escolha dos polissacarídeos CPS e AGS foi baseada em sua eficiente atividade anticoagulante (investigada em trabalhos anteriores), sua fonte não animal, facilidade e baixo custo de obtenção.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho tem como objetivo geral, buscar por componentes sanguíneos capazes de interagir com CPS e AGS e, assim, gerar dados que ampliem o conhecimento a respeito do mecanismo de ação anticoagulante

desses policassarídeos e de outros possíveis efeitos biológicos e adversos relacionados à administração dos mesmos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Remover a albumina presente no soro e no plasma sanguíneo;
- Fracionar os componentes protéicos do sangue;
- Identificar proteínas que interagem com CPS e AGS por fluorimetria diferencial de varredura e MS;
- Construir, com as proteínas identificadas por fluorimetria diferencial de varredura e MS, o complexo proteína-ligante por técnica de *docking molecular*.
- Analisar *in silico* a força de interação desses complexos.

5. METODOLOGIA

5.1 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS CPS E AGS

Os polissacarídeos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani. Eles foram previamente extraídos e purificados (CIPRIANI *et al.*, 2009; MAAS *et al.*, 2012), e sulfatados pelo método de O'Neill (1955). Suas atividades sobre a hemostasia também foram previamente testadas por ensaios *in vitro* de aPTT e ensaios enzimáticos (inibição de trombina e fator Xa).

5.2 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA E SORO

As proteínas foram obtidas a partir do plasma e do soro humano, obtidos de doadores voluntários. A obtenção do plasma foi feita pela centrifugação do sangue coletado em tubos contendo citrato de sódio 3,2% (1:10 v/v; citrato de sódio:sangue). O soro foi obtido pela centrifugação do sangue coagulado coletado em tubos sem anticoagulante.

5.3 REMOÇÃO DA ALBUMINA PRESENTE NO PLASMA E SORO

Para que fosse possível a realização dos testes e a análise dos resultados de interação de compostos com proteínas presentes no plasma e soro, foi necessário que estes passassem por uma etapa de remoção da albumina. Esta proteína, que apresenta peso molecular em torno de 66 KDa, representa aproximadamente 50% do total de proteínas presente no plasma e soro, sendo que sua função biológica está relacionado ao transporte e armazenamento de moléculas pelo sangue (CARTER & HO, 1994; CAMILO & LOURENÇO, 1995). Dessa maneira, devido à alta concentração e grande capacidade de interação com diferentes moléculas, a albumina se torna um grande empecilho para a análise de ensaios de interação de compostos com outras proteínas plasmáticas. Existem na literatura alguns métodos de remoção da albumina por cromatografia e precipitação com sulfato de amônio (KENDALL, 1941; PINHO, 1977). Entretanto, tendo em vista o material disponível no laboratório, praticidade e preservação das outras proteínas presentes no plasma e soro, foi realizada a padronização de um método simples, rápido e de baixo custo, para a remoção da albumina do plasma e do soro. O método consiste em precipitação etanólica associada a mudanças de pH à baixas temperaturas. Para tal, foi adicionado ao plasma ou soro o mesmo volume de salina e o pH foi ajustado para 4.8 utilizando HCl 0,1 M. Esta solução foi centrifugada à 10.000 rpm, à 15°C por 20 minutos. O pellet foi descartado e o pH do sobrenadante foi reajustado para 7.0 utilizando NaOH 0.1 M. Ao sobrenadante (pH 7.0) foi adicionado 28% (v/v) de etanol absoluto gelado. Essa solução ficou repousando por 20 minutos a -20°C. Após esse tempo, a solução foi centrifugada à 10.000 rpm, à 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão em tampão Tris 20 mM pH 8.0. O resultado foi analisado por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 13%.

5.4 FRACIONAMENTO DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS

O fracionamento dos componentes da cascata de coagulação foi realizado utilizando alíquotas de plasma e soro que passaram pelo procedimento descrito acima de remoção da albumina. As proteínas das

alíquotas referentes ao plasma foram fracionadas por cromatografia de exclusão molecular, troca aniônica e troca catiônica usando, respectivamente, a coluna superdex 200 10/300 GL e tampão citrato de sódio 3.2% pH 7.0 como fase móvel, e as colunas Hitrap Q FF 1 e Hitrap SP HP, utilizando para solubilização e ligação da amostra o tampão Tris 20 mM pH 8.0 e para eluição o mesmo tampão acrescido de 1M de NaCl. As proteínas das alíquotas referentes ao soro foram fracionadas por cromatografia de troca aniônica e troca catiônica usando respectivamente as colunas Hitrap Q FF 1 e Hitrap SP HP, utilizando para solubilização e ligação da amostra o tampão Tris 20 mM pH 8.0 e para eluição o mesmo tampão acrescido de 1M de NaCl. O resultado desse fracionamento foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (LAEMMILI, 1970), e as frações cromatográficas que apresentaram perfil protéico semelhante foram unidas em uma mesma alíquota.

5.5 FLUORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (*THERMAL SHIFT*)

Para a análise da afinidade dos compostos (CPS e AGS) pelas diferentes proteínas presentes no plasma e no soro, foram primeiramente realizados ensaios de deslocamento térmico baseado em fluorescência (*thermal shift assay*). Os experimentos foram realizados utilizando as alíquotas obtidas no fracionamento das proteínas do plasma e do soro, sendo que, para este ensaio utilizamos como concentrações finais, uma faixa de 0.5 a 2.5 µg de proteínas totais, 1 mg de CPS ou AGS e *sypro orange* 200x, em um volume final de 25 µL. O experimento foi realizado em uma máquina de PCR Real-Time 7300 (Applied Biosystems).

Cada curva de desnaturação na presença de composto foi comparada com a curva de desnaturação na ausência de composto. Os pontos de inflexão de cada curva de desnaturação (Pi) foram determinados pelo programa GraphPad Prism 6 e para o cálculo de ΔT_m foi usada a equação:

$$\Delta T_m = P_i \text{ na presença de ligante} - P_i \text{ na ausência de ligante.}$$

5.6 ESPECTOMETRIA DE MASSAS

5.6.1 Aquisições por LC-MS/MS

A espectrometria de massas foi realizada com as proteínas presentes nas alíquotas que mostraram interação com os compostos (AGS e CPS) nos ensaios de fluoremetria de varredura diferenciais previamente realizados. As proteínas foram reduzidas com DTT, alquiladas com iodoacetamida e após esses procedimentos digeridas com tripsina. Os peptídeos foram submetidos a análise por LC-MS/MS (MS2) no sistema *Thermo Scientific Easy-nLC 1000 Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) acoplado à um espectrômetro de massas *LTQ-Orbitrap XL ETD (Mass Spectrometry Facility - RPT02H PDTIS* do Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná). As misturas contendo os peptídeos foram aplicadas em uma coluna de 75 mm por 15 cm de comprimento, empacotada com 3,2 μm de resina ReproSil-Pur C18-AQ (Dr. Maisch) em um fluxo de 500 nL/min e subsequentemente eluídas em um fluxo de 250 nL/min com tampão 0,5% de ácido fórmico, 0,5% de DMSO e uma faixa de 5-40% de acetonitrila em um gradiente de tempo de tempo de 120 min. O espectrômetro foi regulado para alternar automaticamente entre MS e MS2 de aquisição de dados. A varredura completa dos espectros de MS (m/z 300-2000) foi realizada no analisador de massas *Orbitrap* com resolução $R = 60.000$ em m/z 400 (após acúmulo de um valor-alvo de um milhão de cargas no *ion trap linear*). O instrumento foi definido para sequencialmente isolar os dez íons que apresentaram sinais mais intensos e fragmentá-los no *ion trap linear* utilizando dissociação induzida por colisão até atingir o valor-alvo de 10.000. Íons previamente selecionados como alvo para o MS/MS foram dinamicamente excluídos durante 90 segundos. O tempo total de cada ciclo foi de aproximadamente 3 segundos. Os parâmetros gerais da espectrometria de massas foram: spray com voltagem de 2,4 kV; sem bainha e fluxo de gás auxiliar; temperatura do tubo de transferência iônica à 100°C; pressão do gás de colisão à 1,3 mTorr; energia de colisão normalizada usando o modo de ativação com cobertura de 35% para MS2. Os limiares para a seleção dos íons foram de 250 contagens. Também foram aplicadas nas aquisições de MS2 uma ativação $q = 0,25$ e tempo de ativação de 30 ms.

5.6.2 Análise dos dados brutos obtidos por MS

Para as análises de espectrometria de Massas contamos com o auxílio do Dr. Paulo Costa Carvalho (FIOCRUZ-PR).

Um conjunto revisado do proteoma de *Homo sapiens* contendo 20.187 sequências foi baixado do banco Uniprot em 04 de julho de 2014. O programa *PatterLab* (CARVALHO, *et al.*, 2008) foi utilizado para gerar um banco de dados alvo, agrupando sequências do subconjunto, adicionando 127 sequências de contaminantes comuns em espectrometria de massas, e, para cada sequência gerando uma versão invertida da mesma. O banco final utilizado para o PSM continha 105.551 sequências. O Comet 2014 rev.é um motor de busca, ao qual foi incorporado ao *PatterLab* (CARVALHO *et al.*, 2012a) e utilizado para comparar os espectros experimentais obtidos por MS em *tandem* contra aqueles que foram teoricamente gerados a partir de nosso banco de dados de sequência. Ele seleciona a sequência peptídica mais provável para cada espectro. Impusemos a carboamidometilação e a oxidação da metionina, respectivamente, como modificação fixa e variável. O Comet aceita peptídeos como prováveis candidatos a cada sequência com uma tolerância de 40 ppm em relação a medida da razão m/z do precursor e utiliza XCorr como uma pontuação preliminar. Para avaliar a validade de PSM foi utilizado o processador do motor de busca (SEPro) (CARVALHO *et al.*, 2012b), que está incorporado no *PatternLab* versão 3.0.0.34. Resumidamente as identificações foram agrupadas de acordo com o estado de carga (+2 e >+3), resultando em dois subgrupos distintos. Para cada resultado o Comet XCorr, DeltaCN, DeltaPPM e os valores coincidentes dos picos foram usados para gerar um discriminador Bayesiano. As identificações foram classificadas em ordem decrescente de acordo com a pontuação. Foi estabelecida uma nota de corte para aceitar uma taxa de apenas 1% de falsos positivos (FDR), em relação ao número de peptídeos. Este procedimento foi realizado de forma independente em cada subconjunto de dados, resultando em um FDR independente do estado de carga. Além disso, um comprimento mínimo de sequência de seis resíduos de aminoácido foi requerido. Os resultados foram pós-processados de forma a aceitar apenas espectros de peptídeos que correspondem a menos de 6 ppm a partir da média de identificação global, e de

forma que as proteínas identificadas apresentassem pelo menos dois peptídeos identificados.

5.6.3 Quantificação relativa de proteínas por MS

A quantificação relativa por espectrometria de massas é um método que compara informações quantitativas de um mesmo analito entre várias amostras. Apesar deste procedimento ser amplamente adotado, sua utilização para a obtenção de valores de quantificação absoluta é um desafio; as principais dificuldades estão em ionizar moléculas diferentes com diferentes eficiências no espectrômetro de massas e o fato de que cada uma das proteínas vai resultar num número diferente de peptídeos após digestão trípica.

Em um estudo prévio, Zybaylov *et al.* (2006) descreveram uma estratégia para normalizar os dados de quantificação de contagem espectral que fornece valores de quantificação mais próximos dos valores absolutos reais (ZYBAYLOV *et al.*, 2006). A contagem espectral é uma estratégia livre de marcador que correlaciona, o número total de espectros obtidos por MS/MS atribuída a uma proteína com a sua abundância relativa. Resumindo, a normalização de Zybaylov *et al.*, chamada Fator de Abundância Espectral Normalizada (NSAF), considera o fato de que as proteínas maiores tendem a ter mais identificações de peptídeos que aquelas menores. Formalmente, o NSAF para uma proteína x é dado pelo número de contagens espectrais (SpC) identificados para esta proteína, dividido pelo seu comprimento (L), dividido pela soma de SpC/ L para todas as N proteínas, no experimento (ZYBAYLOV *et al.*, 2006).

Neste trabalho, utilizamos uma quantificação relativa modificada, tendo raízes em NSAF, para avaliar a eficácia da nossa abordagem de purificação. Resumidamente, em vez de confiar na contagem espectral, aqui denominamos Fator de Abundância Iônica Normalizada (NIAF), que substitui valores de contagens espectrais por valores extraídos de cromatogramas de íons (XIC). Os XIC foram obtidos utilizando o módulo PatternLab's SEProQ (CARVALHO *et al.*, 2012a). Nossa motivação em fazer isso, é que os índices de proteína obtidos por XIC produzem estimativas mais precisas do que as obtidas por contagem espectral.

5.7 ANÁLISE *IN SILICO*.

5.7.1 Desenho da estrutura molecular de CPS

Para o desenho da estrutura molecular de CPS, utilizamos os dados previamente publicados a respeito de sua composição química (MAAS *et al.*; 2012). Com base nesses dados desenhemos a estruturas 2D do mesmo, utilizando para tal o programa *ACD/ChemSketch (Freeware)*. Uma vez, que desenhemos a estrutura em 2D, utilizamos ferramentas do próprio programa para realizamos otimização desta e ajuste dos ângulos de ligação, sendo que após esse procedimentos, utilizando a ferramenta *3D Viewer* para obtermos o modelo estrutural em 3D de CPS. O modelo foi salvo com a extensão .mol, para sua posterior utilização na realização da técnica de *docking* molecular entre CPS e as proteínas identificadas nas análises da espectrometria de massas. Não foi possível realizar a análise *in silico* de AGS e seus prováveis parceiros, uma vez que, sua estrutura química após sulfatação ainda não foi elucidada.

5.7.2 *Docking* molecular

Todas as proteínas que foram identificadas nas análises da espectrometria de massas como potenciais parceiros de CPS possuíam sua estrutura 3D depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) (RICHARDS *et al.*, 2009). Essas estruturas foram submetidas ao *docking* molecular com CPS. O software *Molegro Virtual Docker* (MVD) (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006) foi utilizado para simulações de *docking* molecular. Sendo que foi utilizada uma resolução de 0.30 Å e raio de 10 Å como sítio de ligação para cada uma das cavidades identificadas e testadas nas proteínas. O número de testes foi definido como 10 e o número máximo de interações como 1500. Após cada teste de *docking*, otimização das ligações de hidrogênio foram realizadas para seleção das melhores poses para cada ligante.

5.7.3. Determinação *in silico* da energia de ligação

Para analisar a viabilidade dos complexos gerados pelo MVD estes foram enviados para análise por meio do software PEARLS (Program for Energetic Analysis of Receptor–Ligand System) (HAN *et al.*, 2006) através do

cálculo das energias de interação de proteína-ligante. Este *software* fornece o cálculo de energia livre de ligação e seus componentes energéticos, incluindo van der Waals, electrostáticas, ligação de hidrogênio mediada por água (H-bond), ligação metal-proteína/ligante, mudança de energia livre de solvatação decorrente da ligação das moléculas constituintes, e mudança de entropia conformacional. Campo de força AMBER, potencial de Morse e funções de energia empíricos foram utilizados para calcular as energias de ligação tipo van der Waals, eletrostática, ligação de hidrogênio, a ligação ligante-metal, e as energias de ligação de hidrogênio mediada por água entre a proteína e ligante. A mudança na energia livre de solvatação devida à ligação molecular é estimada utilizando-se um modelo de energia livre de solvatação empírica. Contribuição devida à mudança de entropia conformacional é também estimada por um modelo simples (HAN *et al.*, 2006).

6. RESULTADOS

6.1 REMOÇÃO DA ALBUMINA DO PLASMA E DO SORO

No início do desenvolvimento deste trabalho foram realizados passos de fracionamento das proteínas do plasma e soro, sem que fosse possível alcançar o objetivo, devido à elevada concentração de albumina nas amostras. Esse empecílio nos obrigou a buscar uma maneira de remover essa proteína das amostras, sem, no entanto, causar alterações nas outras proteínas presentes. Como já mencionado, levando em consideração as necessidades impostas para o desenvolvimento do projeto e o material disponível em nosso laboratório, foi desenvolvido e padronizado um protocolo para remoção de albumina das amostras, sendo que este foi previamente descrito em matérias e métodos.

Os resultados obtidos pelas análises por SDS-PAGE em cada passo do processo de remoção da albumina do soro e plasma, estão representados nas figuras 12 e 13.

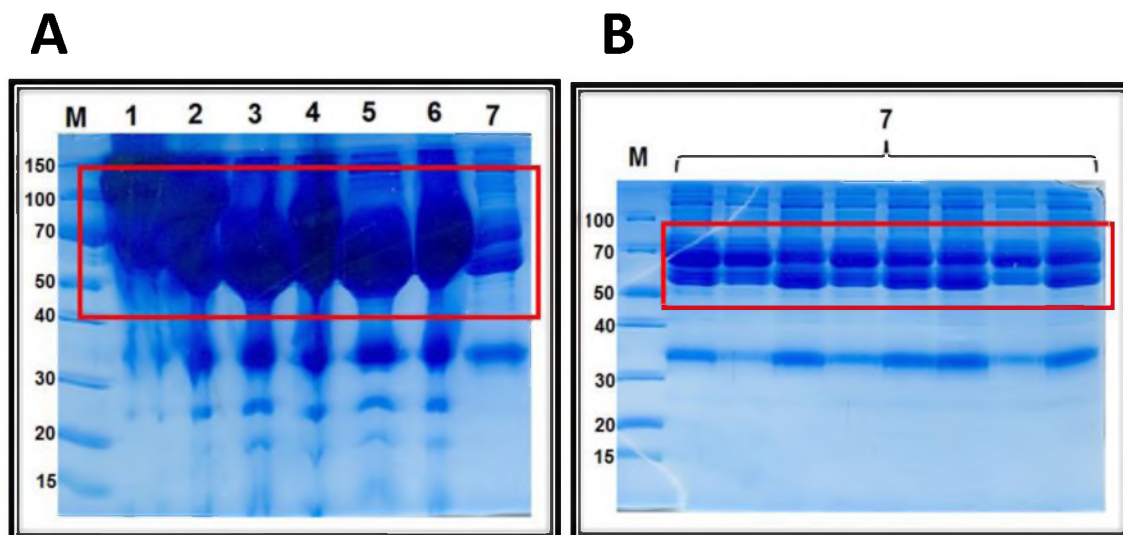


FIGURA 12 – Análise dos resultados de remoção de albumina do plasma. A) Gel da precipitação etanólica do plasma passo a passo - M: marcador de peso molecular, 1 – plasma inicial, 2 – plasma + salina, 3 – plasma pH 4.8 inicial, 4 – plasma pH 4.8 após centrifugação, 5 – plasma pH 7.0, 6 – plasma + ETOH, 7 – plasma precipitado ETOH. B) Gel dos precipitados ETOH do plasma- M: marcador de peso molecular, 7 – plasma precipitado ETOH. O quadrado em vermelho representa a localização de bandas onde a albumina deve estar, quando presente nas amostras.

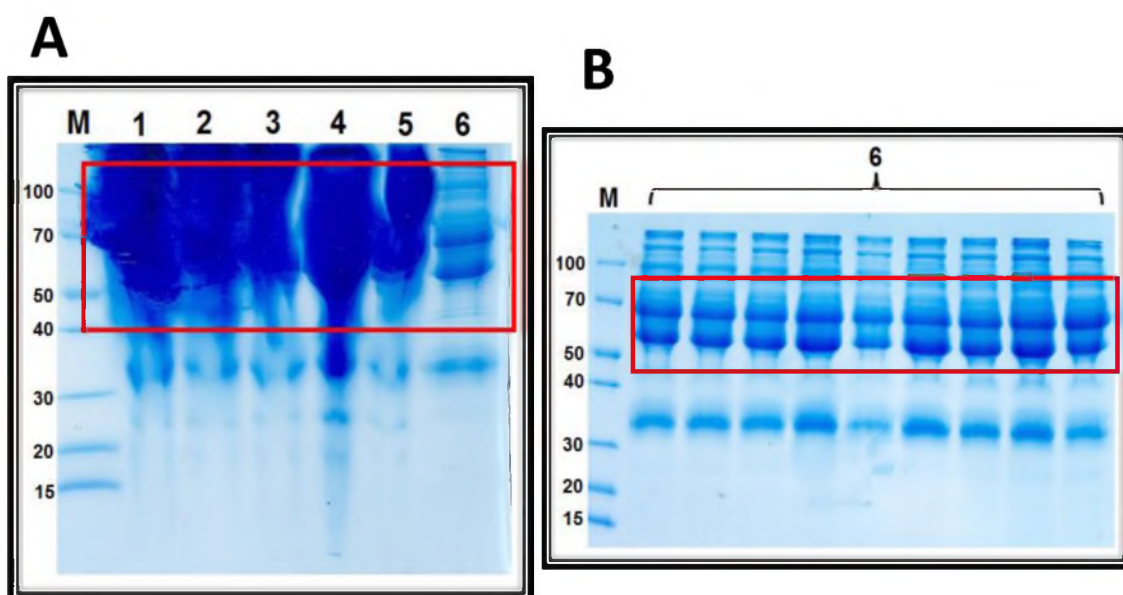


FIGURA 13 – Análise dos resultados de remoção de albumina do soro A) Gel da precipitação etanólica do soro passo a passo - M: marcador de peso molecular, 1 – soro + salina, 2 – soro pH 4.8 inicial, 3 – soro pH 4.8 após centrifugação, 4 – soro pH 7.0, 5 – soro + ETOH, 6 – soro precipitado ETOH. B) Gel dos precipitados ETOH do soro - M: marcador de peso molecular, 6 – soro precipitado ETOH. O quadrado em vermelho representa a localização de bandas onde a albumina deve estar, quando presente nas amostras.

As regiões assinaladas em vermelho nos géis correspondem à região onde a banda referente à albumina é encontrada, quando são realizadas análises por SDS-PAGE nas condições previamente descritas em materiais e métodos. Observando as figuras dos géis, é possível perceber nas frações de 1 a 6 da figura 12A e de 1 a 5 da figura 13A a presença de uma grande quantidade de albumina. O mesmo não é observado nas figuras 12B e 13B, que correspondem respectivamente à alíquotas de plasma e soro após passarem pelo processo de remoção da mesma. Entretanto, detectamos no lugar, um grande *pool* de outras proteínas, o que antes não era possível perceber devido a presença de grande quantidade de albumina que se sobrepunha. Dessa forma, em detrimento dos resultados aqui analisados, pudemos concluir que o protocolo por nós desenvolvido e padronizado foi eficiente no processo remoção da albumina, sem causar precipitação considerável das outras proteínas. Esse resultado foi posteriormente confirmado nas análises por espectrometria de massas.

6.2 FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS

Após passar pelo procedimento de remoção de albumina, alíquotas de plasma e soro foram submetidas a processos cromatográficos, a fim de fracionar as proteínas presentes em cada amostra. As frações obtidas em cada passo cromatográfico foram unidas em alíquotas de acordo com os perfis obtidos em eletroforese.

6.2.1 Fracionamento de proteínas do plasma

Utilizando cromatografia de exclusão molecular, troca catiônica em coluna Hitrap SP HP 1 ml e aniônica em coluna Hitrap Q FF 1 ml, foram obtidas 12 alíquotas distintas de proteínas plasmáticas (GF pl_1, GF pl_2, GF pl_3, GF pl_4, GF pl_5, TI pl_SP_1, TI pl_SP_2, TI pl_SP_3, TI pl_Q_1, TI pl_Q_2, TI pl_Q_3, TI pl_Q_4). Os cromatogramas abaixo e suas respectivas eletroforeses mostram o perfil de cada alíquota (Figuras 14, 15 e 16)

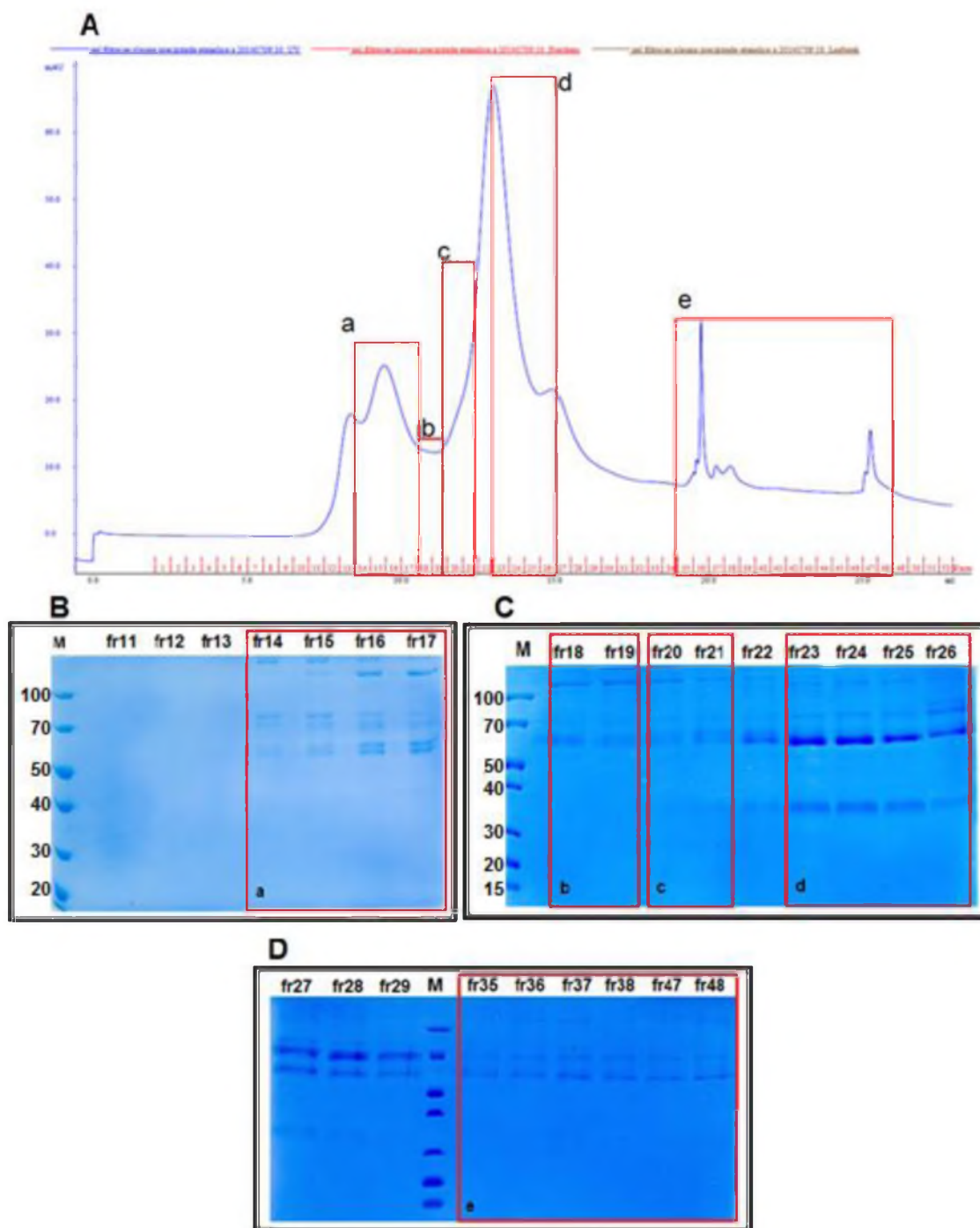


FIGURA 14 – Fracionamento das proteínas do plasma por SEC. A) Cromatograma referente ao fracionamento do plasma livre de albumina por exclusão molecular em coluna superdex 200 10/300 GL e tampão citrato de sódio 3,2% pH 7,0. **B, C, D)** Géis das frações obtidas no processo de cromatografia por exclusão molecular do plasma livre de albumina. M - marcador de peso molecular. A sigla fr acompanhada de um número, corresponde a qual fração está presente em cada poço. Os quadrados em vermelho a, b, c, d, e representam respectivamente as frações que foram unidas nas alíquotas GF pl_1, GF pl_2, GF pl_3, GF pl_4 e GF pl_5.

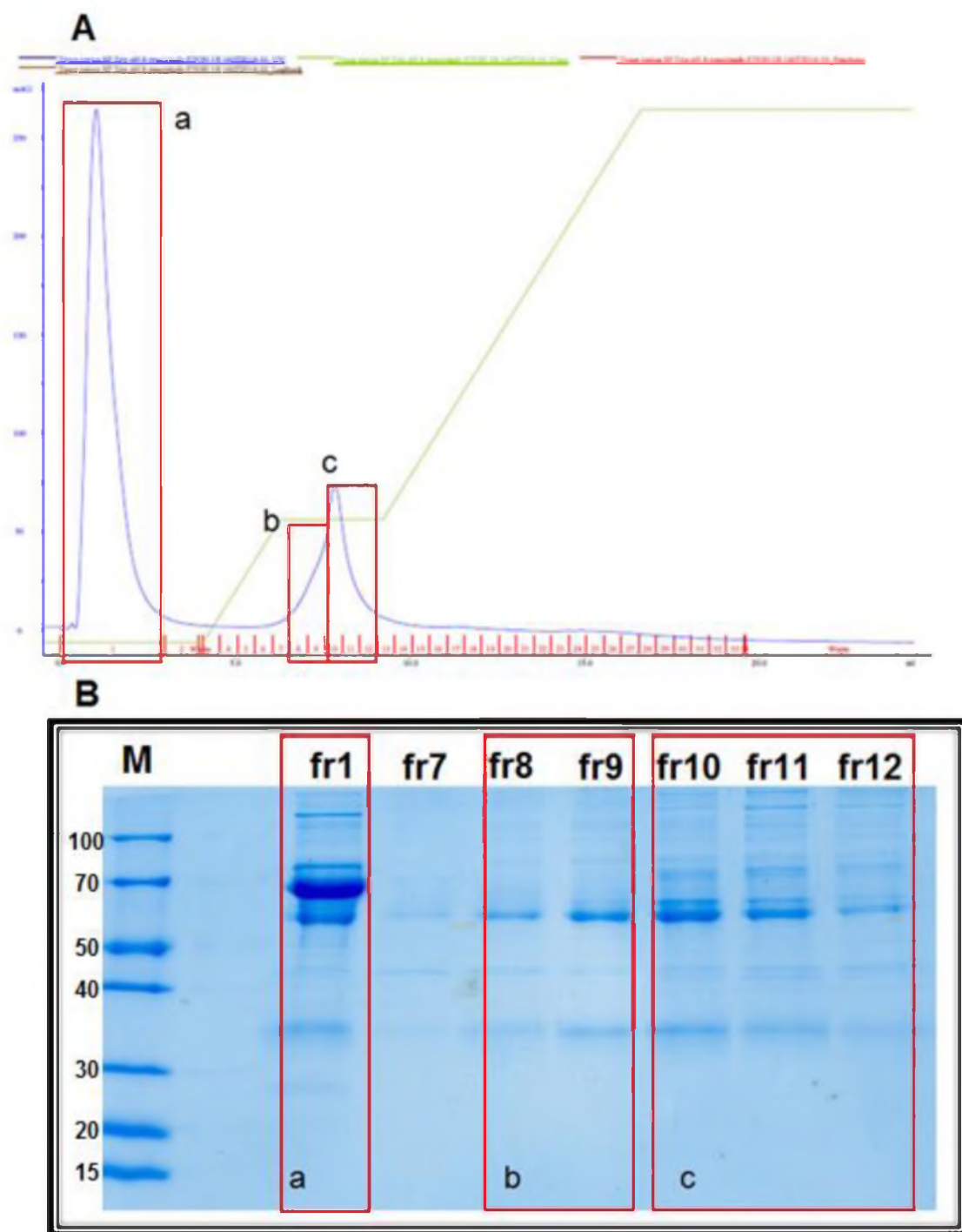


FIGURA 15 – Fracionamento das proteínas do plasma por troca catiônica. A) Cromatograma referente ao fracionamento do plasma livre de albumina por troca catiônica em coluna Hitrap SP HP 1mL, em tampão TRIS 20 mM pH 8.0. **B)** Gel das frações obtidas no processo de cromatografia por troca catiônica do plasma livre de albumina. M - marcador de peso molecular. A sigla fr acompanhada de um número, corresponde a qual fração está presente em cada poço. Os quadrados em vermelho a, b, c representam respectivamente as frações que foram juntadas nas alíquotas TI pl_SP_1, TI pl_SP_2, TI pl_SP_3.

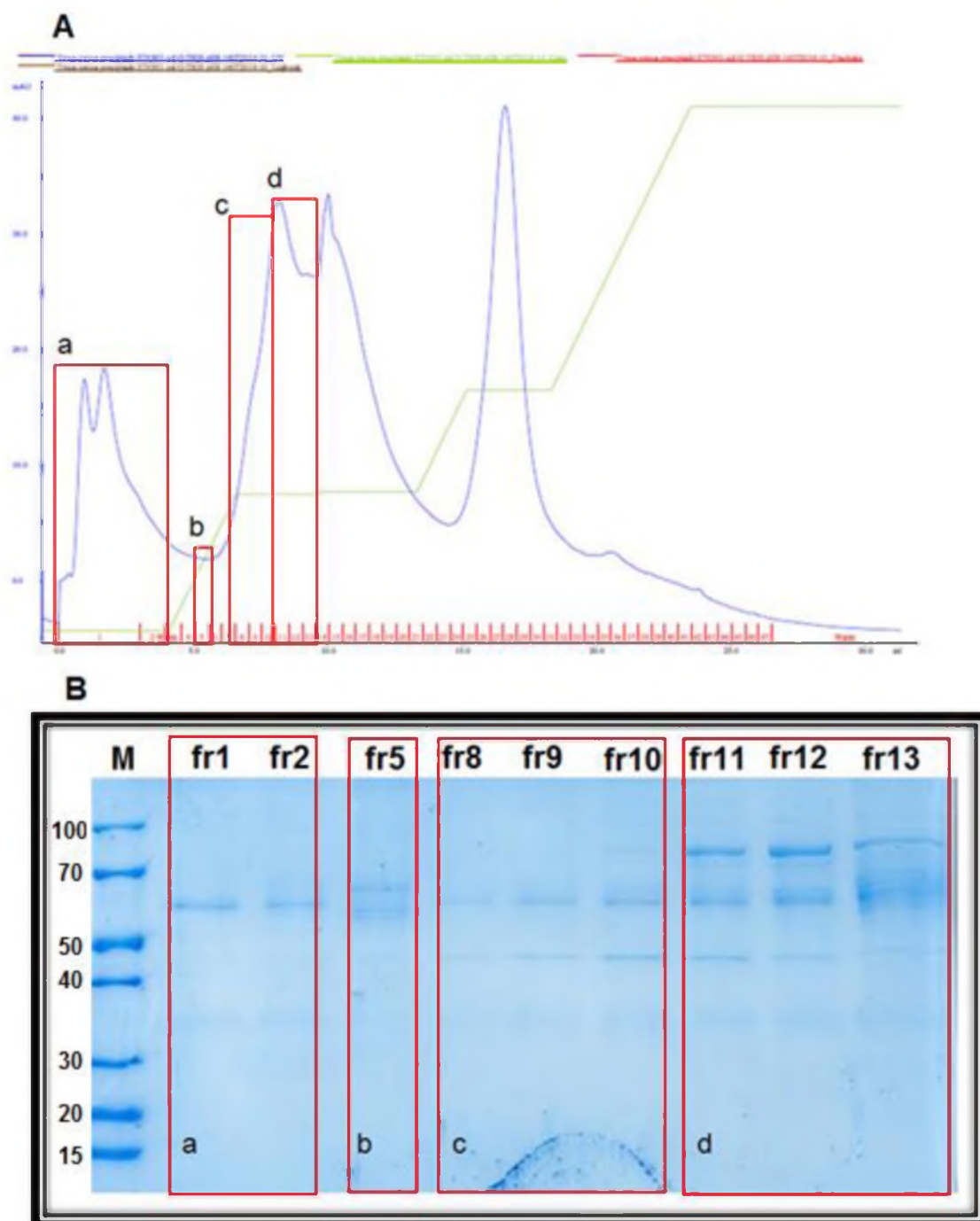


FIGURA 16 – Fracionamento das proteínas do plasma por troca aniônica. A) Cromatograma referente ao fracionamento do plasma livre de albumina por troca aniônica em coluna Hitrap QFF 1mL, em tampão TRIS 20 mM pH 8.0. **B)** Gel das frações obtidas no processo de cromatografia por troca aniônica do plasma livre de albumina. M - marcador de peso molecular. A sigla fr acompanhada de um número, corresponde a qual fração está presente em cada poço. Os quadrados em vermelho a, b, c, d representam respectivamente as frações que foram juntadas nas alíquotas TI pl_Q_1, TI pl_Q_2, TI pl_Q_3, TI pl_Q_4.

6.2.2 Fracionamento de proteínas do soro

Utilizando cromatografia de troca catiônica e aniônica, nós obtivemos 6 alíquotas distintas de proteínas do soro (TI sr_SP_1, TI sr_SP_2, TI sr_Q_1, TI sr_Q_2, TI sr_Q_3, TI sr_Q_4). Os cromatogramas abaixo e seus respectivos géis mostram a constituição de cada alíquota (Figuras 17 e 18).

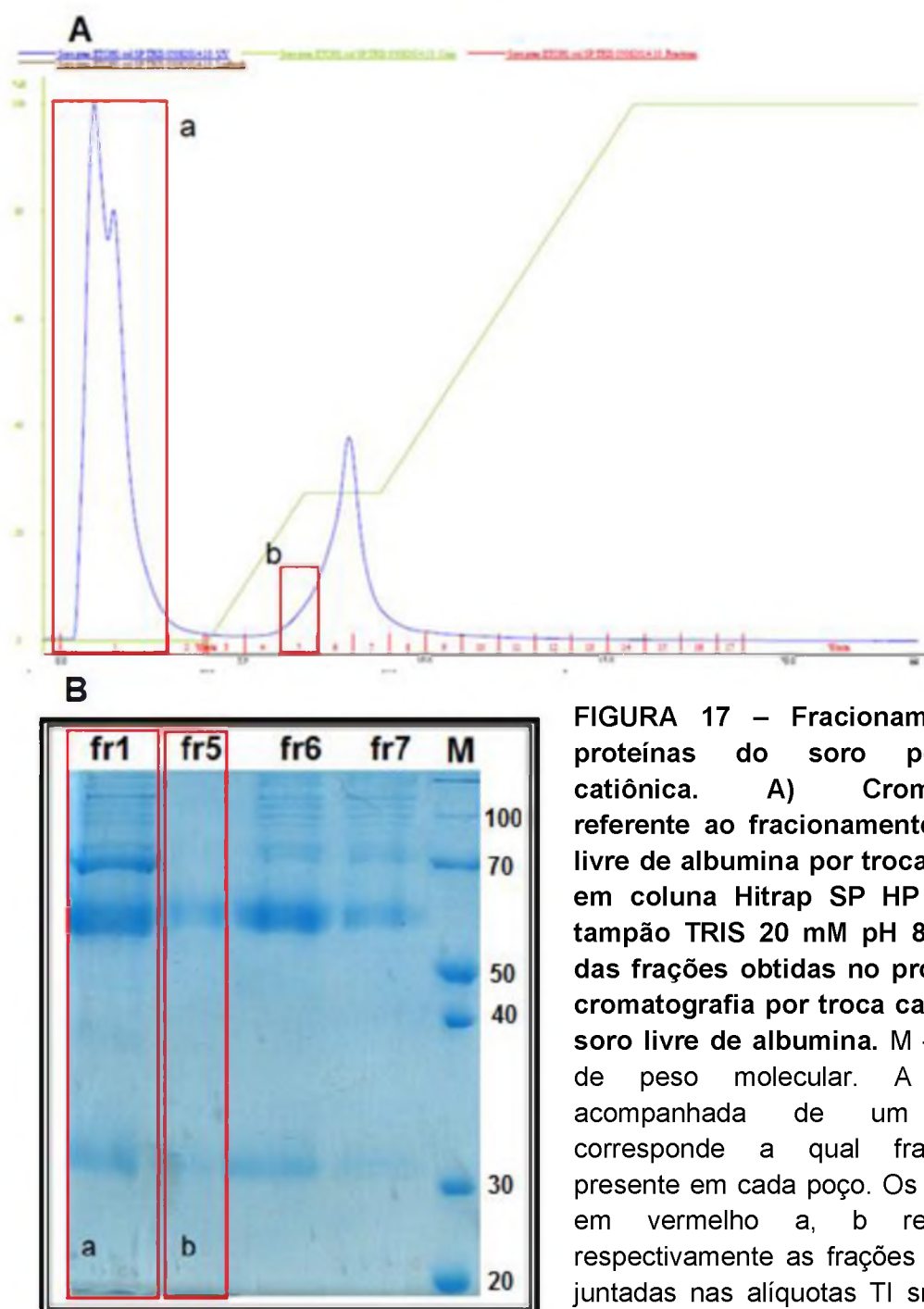


FIGURA 17 – Fracionamento das proteínas do soro por troca catiônica. A) Cromatograma referente ao fracionamento do soro livre de albumina por troca catiônica em coluna Hitrap SP HP 1mL, em tampão TRIS 20 mM pH 8.0. B) Gel das frações obtidas no processo de cromatografia por troca catiônica do soro livre de albumina. M - marcador de peso molecular. A sigla fr acompanhada de um número, corresponde a qual fração está presente em cada poço. Os quadrados em vermelho a, b representam respectivamente as frações que foram juntadas nas alíquotas TI sr_SP_1, TI sr_SP_2.

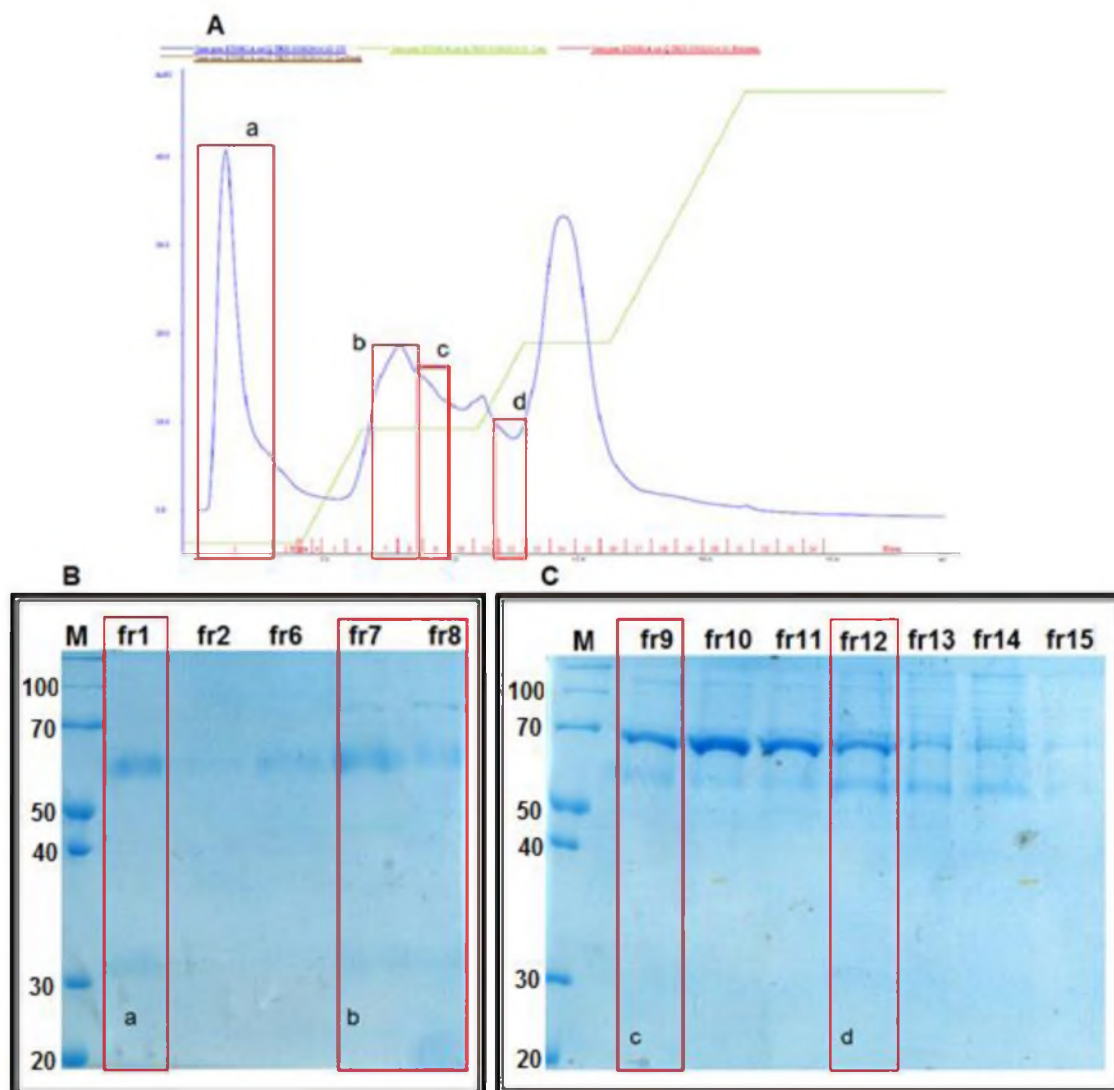


FIGURA 18 – Fracionamento das proteínas do soro por troca aniônica. A) Cromatograma referente ao fracionamento do soro livre de albumina por troca aniônica em coluna Hitrap QFF 1mL, em tampão TRIS 20 mM pH 8.0. B, C) Géis das frações obtidas no processo de cromatografia por troca aniônica do soro livre de albumina. M - marcador de peso molecular. A sigla fr acompanhada de um número, corresponde a qual fração está presente em cada poço Os quadrados em vermelho a, b, c, d representam respectivamente as frações que foram juntadas nas alíquotas TI sr_Q_1, TI sr_Q_2, TI sr_Q_3, TI sr_Q_4.

6.3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS QUE INTERAGEM COM CPS E AGS POR FLUORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA E MS

Pelo método de fluorimetria diferencial de varredura foi possível avaliar a interação dos compostos CPS e AGS com as proteínas presentes em cada alíquota, uma vez que, a interação destes com uma ou mais proteínas gera estabilização térmica que pode ser avaliada pela quantidade de fluorescência emitida pelo corante *sypro orange*. Por MS foi possível identificar e quantificar as proteínas presentes em cada alíquota.

6.3.1 proteínas plasmáticas

A estabilidade das alíquotas de proteínas plasmáticas (GF pl_1, GF pl_2, GF pl_3, GF pl_4, GF pl_5, TI pl_SP_1, TI pl_SP_2, TI pl_SP_3, TI pl_Q_1, TI pl_Q_2, TI pl_Q_3, TI pl_Q_4) foi avaliada pelo ensaio de fluorimetria diferencial de varredura. Para o cálculo de variação de temperatura de fusão (ΔT_m), três experimentos independentes foram realizados e seu valor é a subtração entre T_m na presença de ligantes e T_m das proteínas sem ligantes. Apesar de realizados ensaios que avaliaram a estabilidade de todas as alíquotas plasmáticas, para melhor visualização, a figura 19 mostra apenas os dados referentes às alíquotas que tiveram sua estabilidade térmica influenciada pela adição de CPS e/ou AGS.

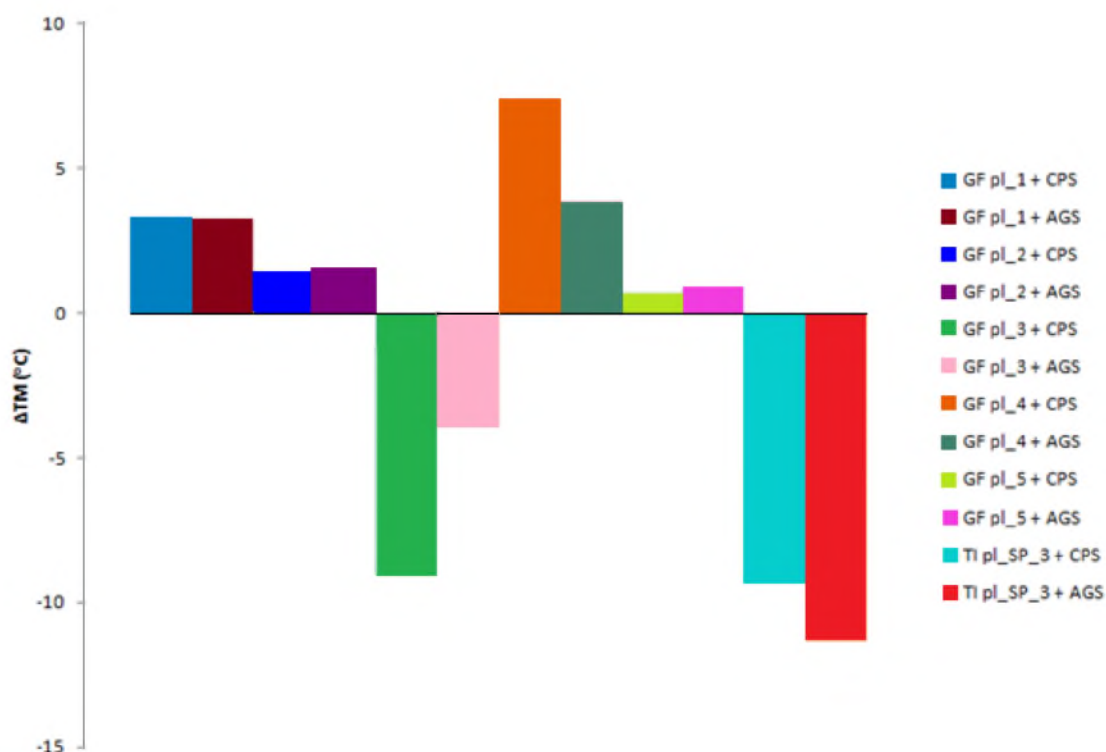


FIGURA 19 – Representação gráfica das amostras plasmáticas que adquiriram estabilidade térmica nos ensaios de *thermal shift*. Gráfico referente ao deslocamento térmico das alíquotas plasmáticas GF pl_1, GF pl_2, GF pl_3, GF pl_4, GF pl_5 e TI pl_SP_3, na presença de CPS e AGS em relação às frações puras (0), obtidos pela técnica de *thermal shift* (experimento realizado em triplicatas).

Todas as alíquotas foram submetidas à espectrometria de massas para identificação da composição protéica. A lista de proteínas identificadas e a sua porcentagem em cada alíquota está depositada em <http://proteomics.icc.fiocruz.br/TCCAline>.

O número de proteínas identificadas é composta por centenas de proteínas e para identificar as prováveis parceiras de CPS e AGS foi utilizada a seguinte abordagem: primeiramente foi realizado o experimento de fluorimetria diferencial de varredura com diferentes concentrações de proteínas a fim de obter-se uma curva de titulação para estimar a concentração mínima de amostra para a emissão de sinal de fluorescência. Em seguida, através do cálculo de NSAF, foi possível determinar a porcentagem de cada proteína nas diferentes alíquotas. Sabendo que a concentração mínima de proteína para detecção de emissão de fluorescência nesse ensaio é de 2 ng (dados do fabricante), conhecendo a porcentagem de cada proteína na amostra e a

concentração mínima de proteína total para sinal de emissão de fluorescência, procurou-se na tabela de identificação por proteínas que estavam abaixo de 2 ng quando não houve detecção de fluorescência e acima do mesmo quando houve detecção.

No anexo I, as tabelas “*Proteínas detectadas em GF pl_1, GF pl_2, GF pl_4, GF pl_5*” (descrevem respectivamente as proteínas presentes nas alíquotas GF pl_1, GF pl_2, GF pl_4, GF pl_5 (amostras que adquiriram estabilidade térmica na presença de CPS e AGS), a porcentagem de cada proteína e a concentração de cada proteína nas alíquotas com presença e ausência de fluorescência quando submetida ao ensaio de fluorimetria diferencial de varredura. A tabela “*Concentração total de proteínas em cada amostra*” também presente no anexo 1, mostra a concentração total de proteínas nas alíquotas GF pl_1, GF pl_2, GF pl_4, GF pl_5 na ausência e presença de fluorescência.

Dessa forma, sabendo a porcentagem de cada proteína em cada alíquota, a concentração total de proteínas nessas alíquotas e que a quantidade mínima de proteína para detecção de fluorescência é de 2ng, assinalamos uma proteína como alvo de CPS e AGS, quando a mesma se apresentava em concentrações abaixo de 2ng nos experimentos onde houve ausência de emissão de fluorescência e acima de 2ng nas condições onde houve detecção de fluorescência (assinalado em cinza nas tabelas). A lista com os prováveis parceiros de CPS e AGS em cada alíquota, que foram escolhidos para realização das análises *in silico* está presente na tabela I.

TABELA I – Prováveis parceiros plasmáticos de CPS e AGS identificados por MS/MS (experimento realizado em triplicatas).

ALÍQUOTA	ID	PROTEÍNA
GF pl_1	sp P00751 CFAB_HUMAN	Complement factor B OS=Homo sapiens N=CFB PE=1 SV=2
	sp P00736 C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1R PE=1 SV=2
	sp P00734 THRB_HUMAN	Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2
	sp P05546 HEP2_HUMAN	Heparin cofactor 2 OS=Homo sapiens GN=SERPIND1 PE=1 SV=3
		Platelet factor 4 OS=Homo sapiens GN=PF4 PE=1 SV=2
GF pl_2	sp P05546 HEP2_HUMAN	Heparin cofactor 2 OS=Homo sapiens GN=SERPIND1 PE=1 SV=3
	sp P00751 CFAB_HUMAN	Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2
	sp P09871 C1S_HUMAN	Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1S PE=1 SV=1
	sp P01019 ANGT_HUMAN	Angiotensinogen OS=Homo sapiens GN=AGT PE=1 SV=1
	sp P00736 C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1R PE=1 SV=2
GF pl5	sp P09871 C1S_HUMAN	Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1S PE=1 SV=1
		Complement component C6 OS=Homo sapiens GN=C6 PE=1 SV=3
		Complement C1q subcomponent subunit B OS=Homo sapiens GN=C1QB
	sp P00736 C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1R PE=1 SV=2

6.3.2 Proteínas do soro

A estabilidade das alíquotas de proteínas do soro (TI sr_SP_1, TI sr_SP_2, Tlsr_Q_1, Tlsr_Q_2, TI sr_Q_3, TI sr_Q_4) foi avaliada pelo ensaio de fluorimetria diferencial de varredura. Para o cálculo de variação de temperatura de melting (ΔT_m), três experimentos independentes foram realizados e seu valor é a subtração entre T_m na presença de ligantes e T_m das proteínas sem ligantes. Apesar de realizados ensaios de estabilidade térmica de todas as

alíquotas plasmáticas, para facilitar a visualização, a figura 20 mostra apenas os dados referentes às alíquotas que tiveram sua estabilidade térmica influenciada pela adição de CPS e/ou AGS.

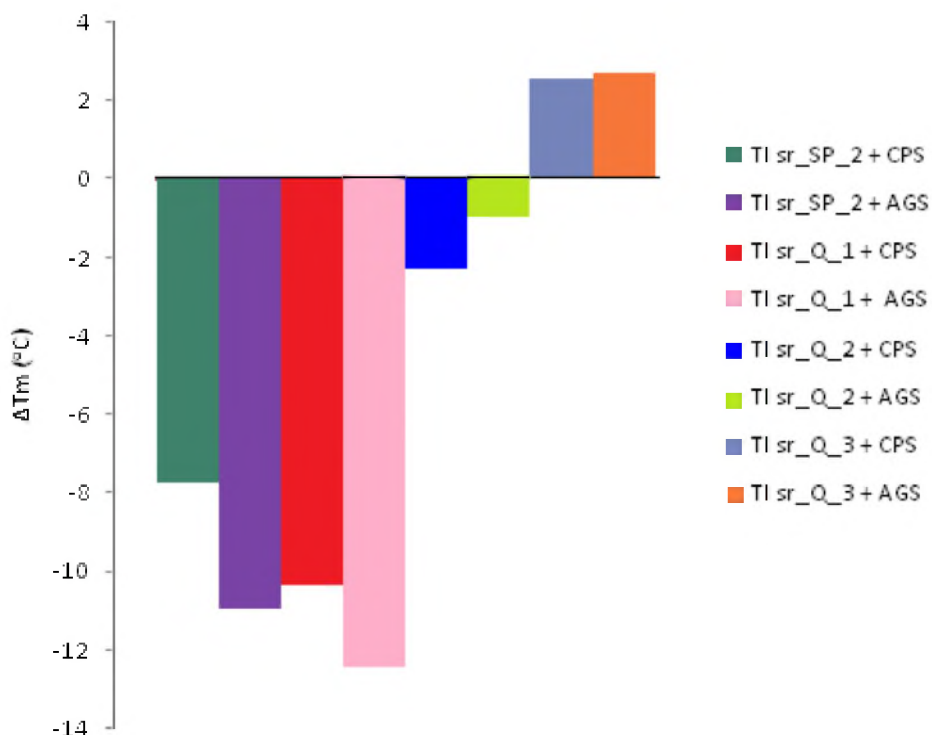


FIGURA 20 – Representação gráfica das amostras do soro que adquiriram estabilidade térmica nos ensaios de *thermal shift*. Representação gráfica referente ao deslocamento térmico das alíquotas do soro TIsr_SP_2, TIsr_3, TIsr_Q_1, TIsr_Q_2 e TI sr_Q_3, TI sr_Q_4 na presença de CPS e AGS em relação às frações puras (0), obtidos pela técnica de *thermal shift* (experimento realizado em triplicatas).

Como é possível perceber no gráfico acima, somente a alíquota TI sr_Q_3, adquiriu estabilidade térmica na presença de CPS e AGS. Entretanto as análises de MS/MS necessitam ser refeitas a fim de identificar as proteínas presentes nesta alíquota e quais os possíveis parceiros de CPS e AGS.

6.4 ANÁLISE EM *IN SILICO* POR DOCKING MOLECULAR

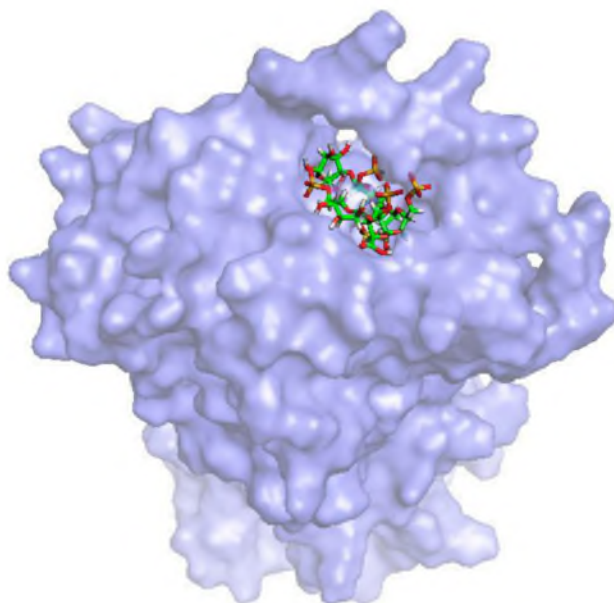
Para determinar os prováveis parceiros plasmáticos de CPS com base nos resultados de fluoremetria diferencial de varredura e espectrometria de massas, utilizamos a técnica de *docking* molecular para mimetizar a interação

proteína-ligante e análises *in silico* de energia de ligação da interação para classificar a probabilidade de cada interação. Análises com o *software* Molegro indicaram as possíveis cavidades para a ligação de compostos em cada proteína presente na lista de possíveis parceiros plasmática de CPS (Tabela I) e a melhor pose foi selecionada para a realização de análises utilizando o *software* PEARLS, sendo que, essas últimas análises indicam a possibilidade de que essa interação ocorra de forma espontânea, ou seja, se é energeticamente favorável. A tabela II nos mostra o resultado obtido com PEARLS, sendo que quanto mais negativa a energia total de interação, mais favorável a ocorrência da mesma, e as figuras de 21-25 mostram as análises *in silico* obtidas para as interações entre as proteínas e CPS que se mostraram energeticamente favoráveis na tabela abaixo.

TABELA II – Energia total de interação para cada um dos prováveis parceiros plasmáticos de CPS identificados por análises realizadas no *software* PEARLS. Quanto mais negativa a energia total de interação, mais favorável a interação.

Proteína	Energia total de interação	Proteína	Energia total de interação
Angiotensinogênio + CPS	-13.75 Kcal/mol	Componente C6 do complemento + CPS	19.12 Kcal/mol
Cofator II da heparina + CPS	-1.02 Kcal/mol	Protrombina + CPS	3.01 Kcal/mol
Fator B do complemento + CPS	-15.24 Kcal/mol	Subunidade A do subcomponente C1q do complemento + CPS	3.79 Kcal/mol
Fator plaquetário 4 + CPS	-10.47 Kcal/mol	Zimogênio da protease C1s do complemento + CPS	24.59 Kcal/mol
Zimogênio da protease C1r do complemento + CPS	-7.18 Kcal/mol		

A



B

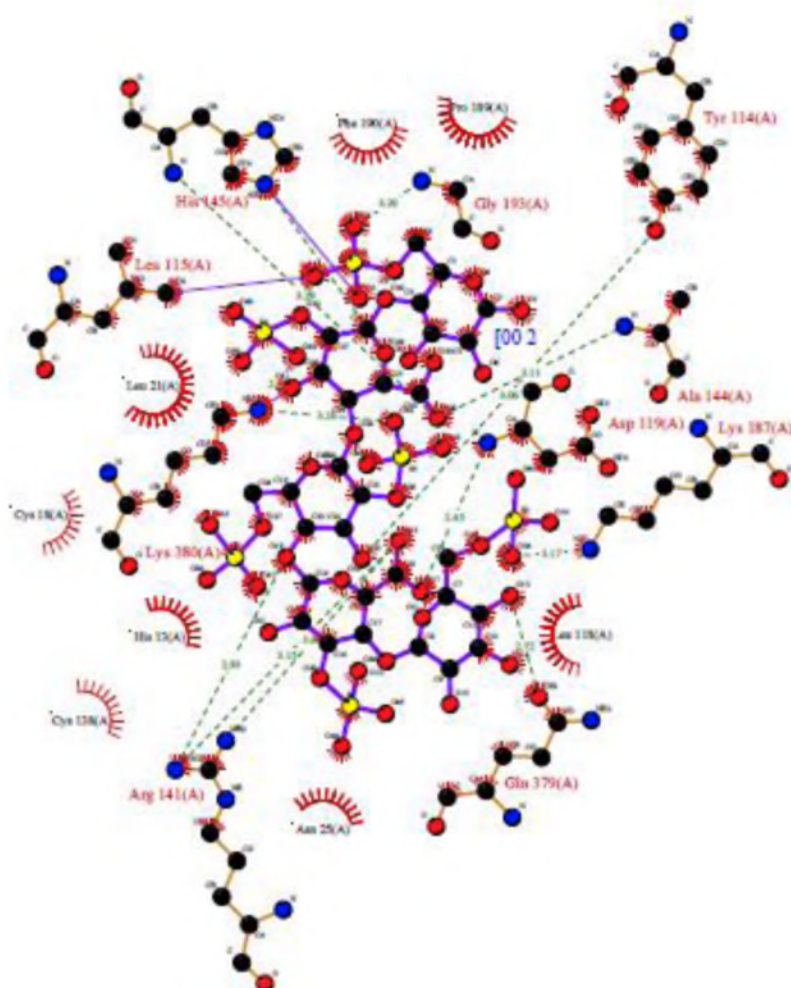
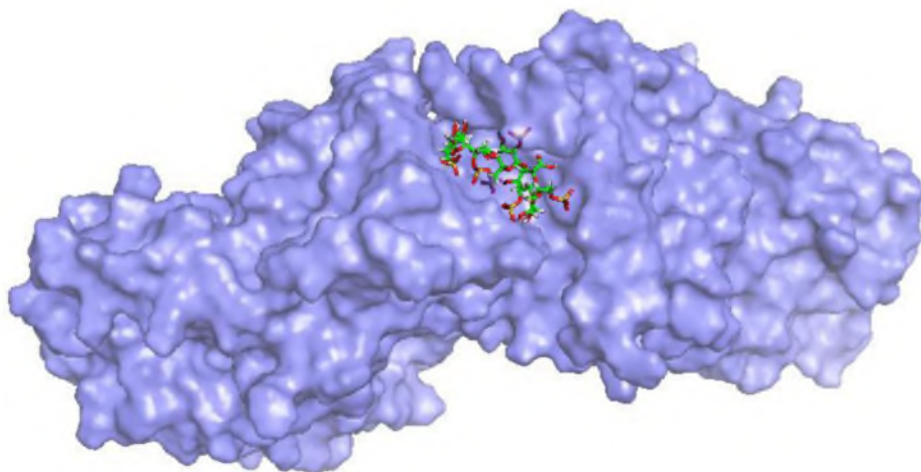


FIGURA 21 – Docking molecular do angiotensinogênio humano (PDB 2WXW) interagindo com CPS. A) Estrutura 3D do angiotensinogênio humano interagindo com CPS na cavidade de ligação que mostrou maior afinidade. B) Ligações eletrostáticas e interações de Van der Walls formadas entre CPS e o angiotensinogênio humano na cavidade de ligação mostrada em 21A.

A



B

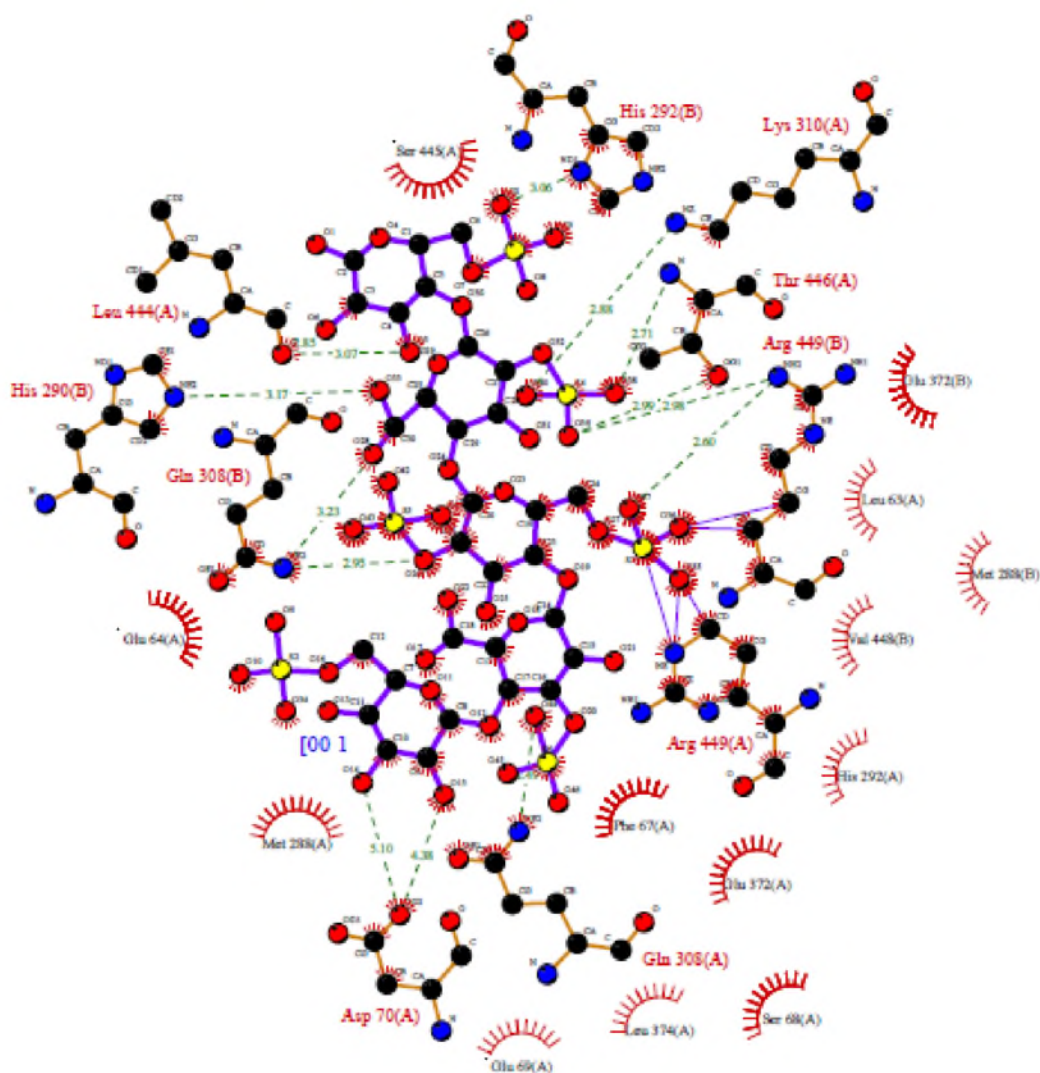
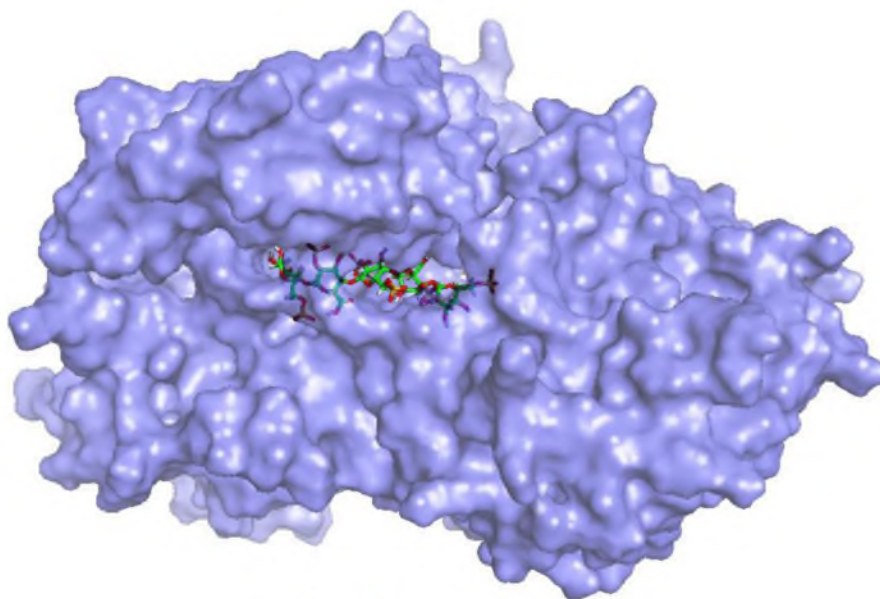


FIGURA 22 – Docking molecular do cofator II da heparina (PDB 1JMJ) interagindo com CPS. A) Estrutura 3D do CHII interagindo com CPS na cavidade de ligação que mostrou maior afinidade. B) Ligações eletrostáticas e interações de Van der Waals formadas entre CPS e o CHII na cavidade de ligação mostrada em 22A.

A



B

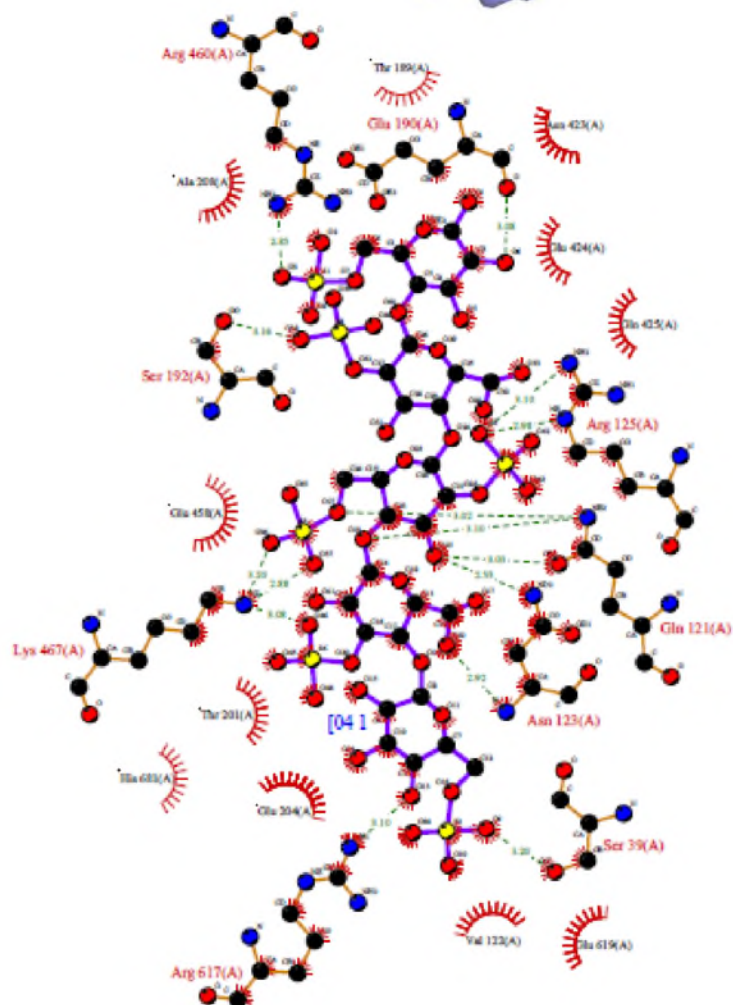
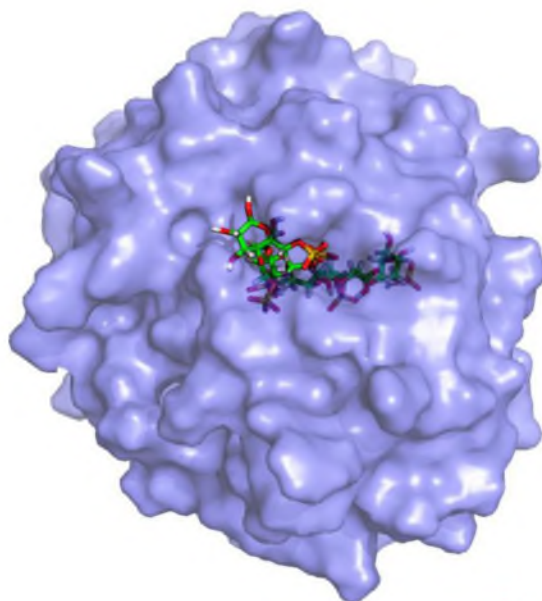


FIGURA 23 – *Docking* molecular do fator B do complemento (PDB 2OK5) interagindo com CPS. A) Estrutura 3D do fator B do complemento interagindo com CPS na cavidade de ligação que mostrou maior afinidade. B) Ligações eletrostáticas e interações de Van der Walls formadas entre CPS e o Fator B do complemento na cavidade de ligação mostrada em 23A.

A



B

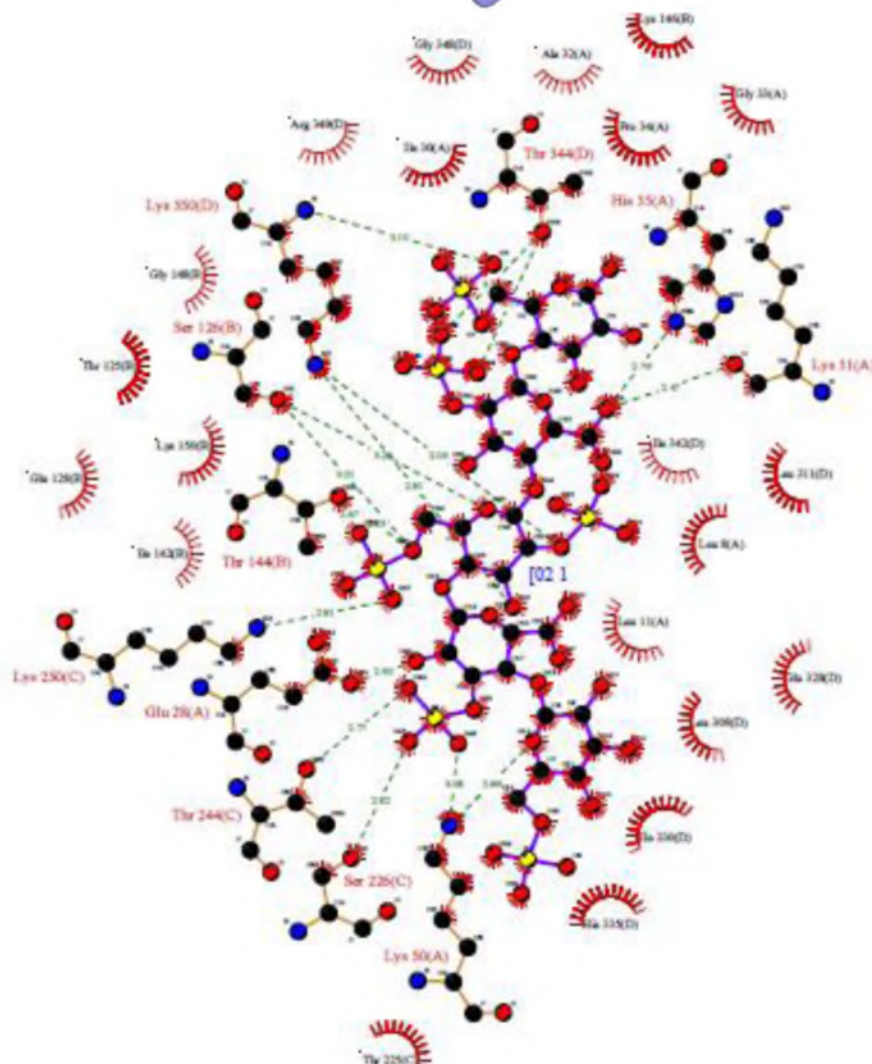
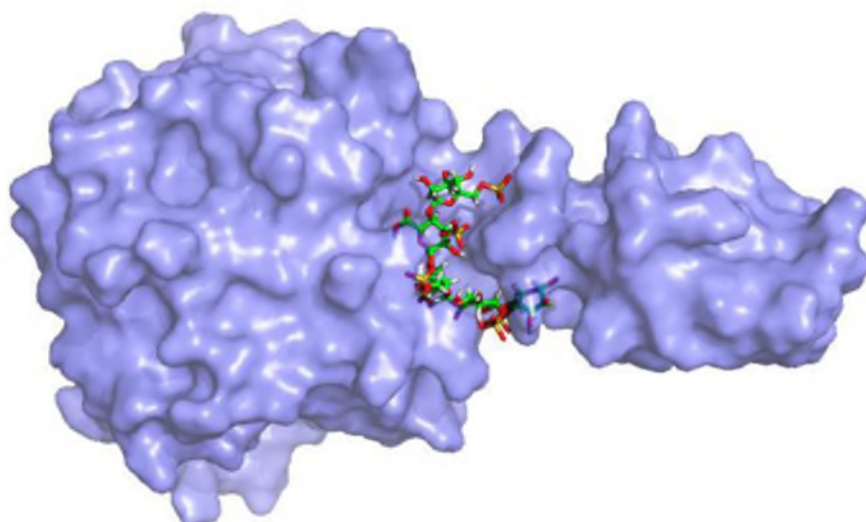


FIGURA 24 –Docking molecular do fator plaquetário 4 (PDB 1F9Q) interagindo com CPS. A) Estrutura 3D do fator plaquetário 4 interagindodo com CPS na cavidade de ligação que mostrou maior afinidade. B) Ligações eletrostáticas e interações de Van der Walls formadas entre CPS e o Fator plaquetário 4na cavidade de ligação mostrada em 24A.

A



B

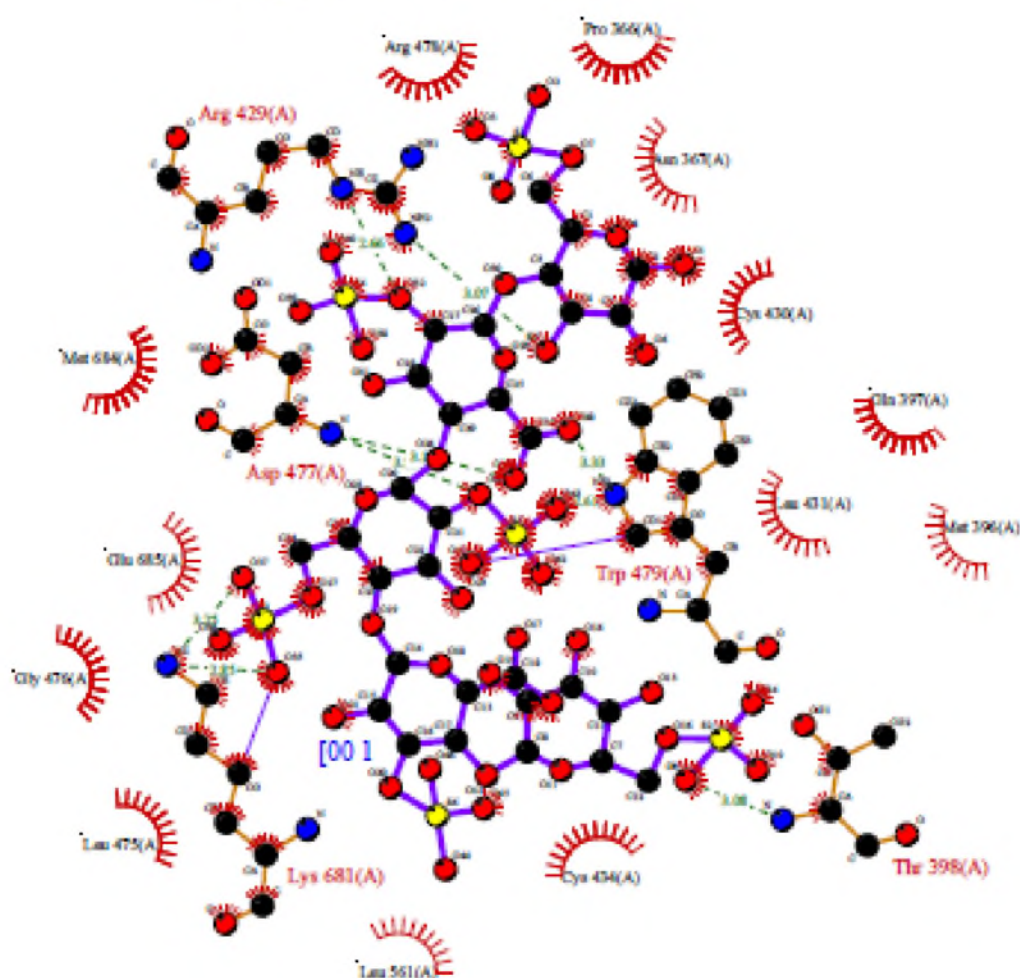


FIGURA 25 – *Docking* molecular do zimogênio da protease C1r co complemento (PDB 1md7) interagindo com CPS. A) Estrutura 3D do zimogênio da protease C1r do complemento interagindo com CPS na cavidade de ligação que mostrou maior afinidade. B) Ligações eletrostáticas e interações de Van der Walls formadas entre CPS e o zimogênio da protease C1r do complemento na cavidade de ligação mostrada em 25A.

7. DISCUSSÕES

7.1 REMOÇÃO DA ALBUMINA DO PLASMA E DO SORO

Pode-se considerar a remoção da albumina das amostras do plasma e soro o principal passo para que fosse possível a continuidade do projeto. Como já citado anteriormente, a albumina é a proteína plasmática mais abundante, correspondendo a cerca de 50% do total das proteínas presentes no plasma humano (CAMILO & LOURENÇO, 1995), sendo que, essa altíssima concentração albumínica em relação ao restante das proteínas plasmáticas, torna os estudos de interação entre bioligantes com proteínas do sangue um verdadeiro desafio.

No início do processo de desenvolvimento desse projeto foram realizadas tentativas de identificação de alvos de CPS e AGS em amostras de plasma e soro que não haviam passado por etapas de remoção da albumina, sendo que os resultados obtidos foram inconclusivos. A presença de alta concentração de albumina nas amostras impossibilitou o processo de fracionamento das proteínas do plasma e soro por cromatografia. Quando a albumina não se ligava às colunas cromatográficas com alta afinidade saturando-as e impedindo o eficiente processo de fracionamento, acabava por contaminar todas as frações cromatográficas, mascarando a presença das outras proteínas e tornando as análises por SDS-PAGE confusas e inconclusivas. Além do que, as análises por MS das amostras também ficaram comprometidas na presença das altas concentrações de albumina, pois, a capacidade de penetrância do equipamento nas análises é inferior à relação de quantidade entre a albumina e grande parte das proteínas presentes no plasma e soro. Dessa forma, muitas vezes, o equipamento não conseguiu detectar a presença de várias proteínas que deveriam constar nas amostras, devido ao excesso de peptídeos albumínicos. Sendo assim, as análises por MS também se tornavam incompletas e inconclusivas.

Somente após submeter às amostras de plasma e soro ao processo de remoção de albumina aqui padronizado, foi possível realizar as etapas subsequentes necessárias à obtenção dos resultados expostos.

7.2 FRACIONAMENTO DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS

O fracionamento dos componentes sanguíneos é a etapa inicial para o processo de montagem do “quebra-cabeças” que posteriormente nos levou a identificação dos componentes plasmáticos capazes de interagir com CPS. Quando realizamos o fracionamento das proteínas nas amostras de plasma e soro, separamos a totalidade destas, em alíquotas distintas que apresentam diferentes *pools* protéicos. Dessa forma, após as análises de interação por fluorimetria diferencial de varredura e MS, se tornou possível encontrar os prováveis parceiros de CPS e AGS e excluir os componentes que não interagiram. Para facilitar a compreensão, podemos pensar em uma situação hipotética. Suponhamos que estivéssemos buscando os prováveis parceiros de um composto *X* em uma determinada amostra composta pelas proteínas *A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F* e *G*, e que dentre estas, somente as proteínas *A* e *B* sejam capazes de interagir com o composto *X*. Se as proteínas *A* e *B* estivessem nas mesmas concentrações que *C* e *D*, que não interagem com o composto *X*. Após a realização de análises de interação por fluorimetria de varredura diferencial e MS com a amostra total, supondo que as proteínas *E*, *F* e *G*, estivessem abaixo da faixa de concentração para detecção por fluorimetria de varredura diferencial, encontraríamos que as proteínas *A*, *B*, *C* e *D* são prováveis parceiras do composto *X* (Figura 26) e teríamos que submeter essas quatro proteínas à análises posteriores afim de confirmar o resultado (situação 1). Entretanto, se subtessemos a amostra a etapas de fracionamento onde obtivéssemos, por exemplo, quatro alíquotas distintas, sendo que as alíquota 1 seria composta pelas proteínas *G*, *F* e *D*, alíquota 2 pelas proteínas *A*, *C* e *F*, alíquota 3 pelas proteínas *B*, *E* e *G* e alíquota 4 pelas proteínas *C*, *D* e *E*. Após análises por fluorimetria de varredura diferencial e MS perceberíamos que as alíquotas que apresentam as proteínas *C* e *D* sem a presença de *A* ou *B* não demonstram interação com o composto *X* (Figura 27) e isso nos possibilitaria identificar seus parceiros mais facilmente. (situação 2). Os mesmo raciocínio pode ser extrapolado para este trabalho, sendo que o processo de fracionamento das proteínas do plasma e soro diminuiu as possibilidades e facilitou grandemente a busca pelos parceiros de CPS e AGS.

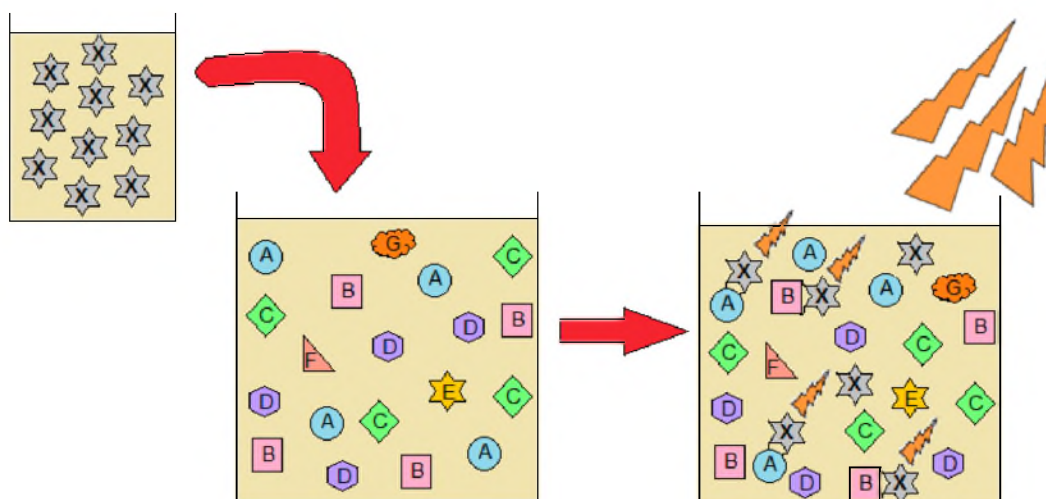


FIGURA 26 – Representação esquemática da situação 1. Após análise por fluorimetria diferencial de varredura e MS, chegaríamos a conclusão que o composto X pode estar interagindo com qualquer um dos compostos que esteja presente em quantidades suficientes para ser detectado por fluorimetria diferencial de varredura, no caso não saberíamos se interação está ocorrendo com A, B, C ou D ou com todos e teríamos que realizar mais análises para chegar a uma conclusão.

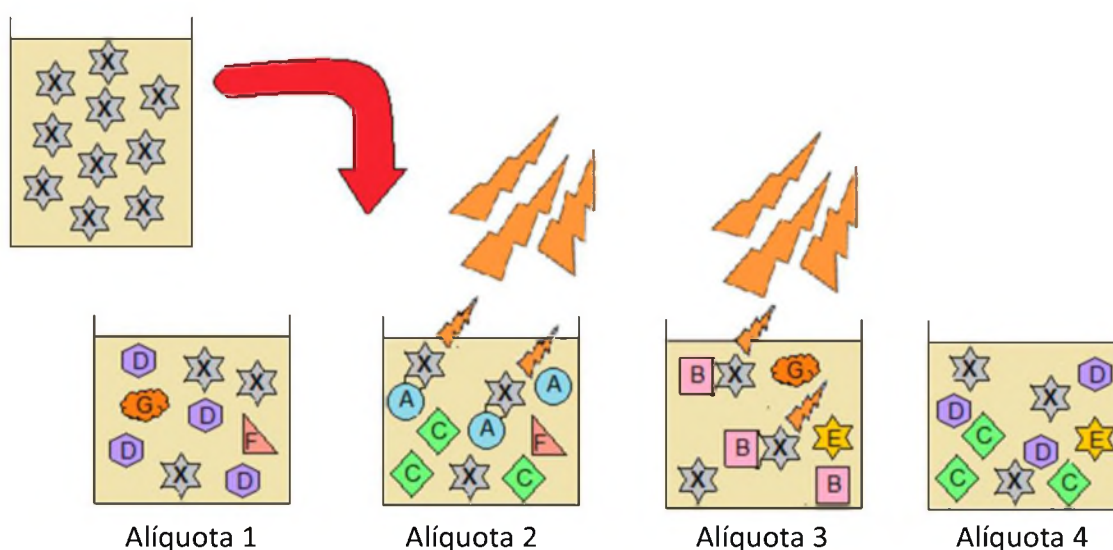


FIGURA 27 – Representação esquemática da situação 2. Após fracionamento da amostra e análise por fluorimetria diferencial de varredura e MS, chegaríamos a conclusão que o composto X está interagindo com as proteínas A, B, uma vez, que as proteínas C e D, embora estejam em concentrações suficientes para ser detectadas por fluorimetria diferencial de varredura, não emitem sinal de fluorescência na presença do composto X, como podemos observar no esquema acima.

7.3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS QUE INTERAGEM COM CPS E AGS POR FLUORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA E MS E ANÁLISES *IN SILICO*.

A análise conjunta dos resultados obtidos por Fluorimetria Diferencial de Varredura e MS nos levaram, de acordo com as alíquotas que apresentaram sinal de interação com CPS e/ou AGS e suas respectivas composições e concentrações, às proteínas que são potenciais parceiros de tais compostos.

No entanto, em centenas de proteínas detectadas, chegamos a cerca de 4 proteínas que são prováveis parceiras de CPS e/ou AGS. A análise *in silico* objetivou avaliar cada interação a fim de confirmar quais interações são prováveis e quais são improváveis de ocorrer na natureza.

As análises *in silico* nos mostraram que, dos prováveis parceiros plasmáticos de CPS identificados por fluorimetria diferencial de varredura e MS, somente a interação entre CPS e o angiotensinogênio, o cofator II da heparina (HCII), o fator B do complemento, o fator plaquetário 4 e o zimogênio da protease C1r do complemento são energeticamente favoráveis (Tabela II). Ou seja, podem ocorrer espontaneamente sem a participação de uma enzima ou outro parceiro. Esses resultados são interessantes, pois mostram que além da atividade anticoagulante de CPS, já evidenciada em um trabalho anterior realizado por Mass *et al.* (2012), foi agora evidenciada a provável interação de CPS com o HCII. Além disso, foi agora verificado que CPS também pode estar envolvido em atividades relacionadas ao sistema de defesa contra patógenos, evidenciado nas prováveis interações de CPS com fatores do complemento e também em processos relacionados ao controle da pressão arterial evidenciado na provável interação de CPS com o angiotensinogênio.

A atividade anticoagulante de CPS, como citado anteriormente, já foi demonstrada em um trabalho anterior. Polissacarídeos sulfatados normalmente interagem com o HCII e a AT, potencializando o efeito inibitório do HCII e da AT sobre a trombina e da AT sobre o fator Xa (POMIN, 2009). As análises *in silico* realizadas neste trabalho mostraram que a interação entre CPS e o HCII é energeticamente favorável nas condições de pH fisiológico, apresentando uma energia total de interação de -1,02 kcal/mol. Entretanto, a interação de

CPS e protrombina apresenta uma energia total de interação positiva de 3,01 kcal/mol, ou seja, para que essa interação ocorra, é necessário que seja fornecido 3,01 kcal/mol de energia. Dessa forma, analisando esses dados, associados aos dados previamente publicados por Mass *et al.* (2012), obtivemos o indício, de que CPS pode interagir isoladamente com o anticoagulante endógeno HCII e facilitar a interação deste com a trombina, sendo ainda que, existe a possibilidade que na presença de trombina, CPS possa interagir com o complexo fortalecendo a interação, e para tal apresente uma energia total de interação ainda mais negativa. Todavia, para confirmar essas especulações são necessários testes adicionais com o complexo. Em relação à protrombina, os resultados das análises *in silico*, nos mostram, que nas condições de pH fisiológico, CPS não é capaz de interagir isoladamente com a mesma para impedir sua conversão em trombina. Análises entre CPS e a trombina isolada não foram realizadas, pois além desta não ter sido apontada nos ensaios de fluorimetria de varredura diferencial e MS como possível alvo de CPS, testes enzimáticos, previamente realizados por Mass *et al.* (2012) já mostraram que CPS não era capaz de inibir a trombina na ausência de HCII ou AT.

Os resultados desse trabalho, também mostraram que CPS, assim como a heparina, é capaz de interagir com o fator plaquetário 4, sendo que no caso da heparina essa interação pode levar ao desenvolvimento de trombocitopenia induzida por heparina. A patogenia desse transtorno é caracterizada, pela formação de um complexo multimolecular entre fator plaquetário 4 e heparina, sendo este, alvo antigênico de anticorpos heparina-dependente (ROBINSON & LEWIS, 1999). A formação desse complexo resulta em agregação e destruição plaquetária e em lesões no endotélio vascular, o que gera por consequência, a ativação da cascata de coagulação e aumento da síntese de trombina (WALENGA & BICK, 1998; CHONG & EISBACHER, 1998). Este fato como um paradoxo, pode aumentar o risco de complicações tromboembólicas em pacientes que fazem uso de heparina e desenvolvem esse transtorno, sendo este, um dos graves efeitos colaterais associados ao seu uso (CHONG & EISBACHER, 1998; GREINACHER *et al.*, 1999). Dessa forma, a interação de

CPS com este mesmo fator plaquetário pode levar também ao mesmo efeito colateral que a interação deste com a heparina.

As análises *in silico* também apontaram para a possibilidade que CPS possa interagir com a proteína angiotensinogênio, o que pode estar associado a um possível papel deste polissacarídeo sobre o controle da pressão arterial. Caso a interação de CPS com o angiotensinogênio de alguma forma bloqueie ou dificulte a clivagem deste no decapeptídeo angiotensina I, essa interação pode então auxiliar em processos de diminuição da pressão arterial. Esse seria um efeito bastante interessante em complemento ao seu já comprovado efeito anticoagulante, uma vez que, uma futura aplicação clínica deste, em pacientes hipertensos com propensão a transtornos tromboembólicos, poderia ser bastante interessante. Todavia, também existe a possibilidade dessa interação não acarretar em nenhum efeito sobre o processo de formação de angiotensina I ou até então aumentá-la, sendo que, neste último caso, esse efeito colateral pode ser uma restrição em futuras aplicações clínicas de CPS, podendo aumentar o risco de processos hemorrágicos, entre outros. Todavia, para que seja possível compreender se a interação entre CPS e angiotensinogênio realmente causa algum efeito e caso cause, qual seria ele, são necessários outros ensaios complementares.

A possibilidade de interação entre CPS com o zimogênio da protease C1r e com o fator B do complemento também observadas em nossos resultados, podem apontar para um possível efeito imunossupressor ou imunoestimulante deste. Sabe-se que o sistema complemento faz parte do sistema imune inato e é responsável por um dos principais mecanismos efetores da imunidade mediada por anticorpos (CRUVINEL *et al.*, 2010). O sistema complemento é ativado por três vias, a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas. Na via clássica, ocorrem reações sequenciais envolvendo C1, C4, C2 e C3, sendo que a via se inicia com a ligação de C1 aos domínios Fc das imunoglobulinas IgM e IgG (ABBAS & LICHTMAN, 2003). C1 é um complexo multimolecular formado por três frações (C1q, C1r e C1s), sendo que as frações C1r e C1s apresentam atividade enzimática que levam à clivagem de C2 e C4 que são então ativados reagindo com os outros componentes da cascata e culminando no complexo lítico de ataque a membrana (ABBAS &

LICHTMAN, 2003). Na via alternativa o fator D é homólogo ao C1s da via clássica, o C3 equivale ao C4 e o fator B equivale ao C2 (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Dessa maneira, caso a interação de CPS com o zimogênio da protease C1r e com o fator B iniba a atividade proteolítica dessas enzimas, pode levar a uma diminuição da atividade do sistema complemento. Todavia, levando em consideração que existe uma terceira via de ativação desse sistema, e que essa via independe desses fatores, essa interação pode também não levar a nenhum efeito biológico. Existe também a possibilidade que a interação de CPS e tais fatores do sistema complemento cause uma ativação ou aumento da atividade dos mesmos, nesse caso, isso poderia ser um efeito colateral indesejável, uma vez que, a ativação exacerbada desse sistema pode levar a danos celulares e teciduais (FLEMING & TSOKOS, 2006).

Algo importante a se ressaltar, é que todos os possíveis efeitos de CPS citados acima, são especulações com base nos indícios fornecidos pelos dados obtidos neste trabalho, que direcionarão testes complementares para futuros estudos para sua confirmação.

8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados até agora obtidos neste trabalho e dados da literatura, podemos concluir que CPS é capaz de interagir diretamente com CHII, provavelmente favorecendo sua interação com a trombina, e que a interação de CPS com a AT provavelmente depende desta estar associada á trombina ou o Fator Xa, entretanto, testes complementares necessitam ser feitos para confirmar esses resultados. Os resultados deste trabalho também forneceram fortes indícios de que um possível uso terapêutico de CPS, assim como da heparina, poderia estar associado ao risco do desenvolvimento de trombocitopenia como efeito coleteral.

Além da interação de CPS com fatores relacionados à hemostasia, também foi possível observar que este pode interagir com diferentes proteínas plasmáticas fornecendo indícios, de que, além da atividade anticoagulante, CPS também pode apresentar atividade sobre o sistema renina-angiotensina

de controle da pressão arterial e sobre o sistema complemento, entretanto, testes complementares também necessitam ser realizados para confirmação destes indícios.

9. PERSPECTIVAS

- Realização da análise estrutural de AGS após a sulfatação para que seja possível realizar as análises *in silico* de *docking* molecular desse composto e seus prováveis parceiros plasmáticos.
- Refazer os ensaios de MS das alíquotas do soro, para que seja possível apontar os possíveis parceiros de CPS e AGS nessa amostra e também realizar ensaios de *docking* molecular entre esses prováveis parceiros e CPS ou AGS.

10. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Cellular and Molecular Immunology. **6th ed. Saunders**, 2003.

ALBAN, S.; SCHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. **Carbohydr. Polymers**, v. 47, p. 267-276, 2002.

ALBAN, S.; JESKE, W.; WELZEL, D.; FRANZ, G.; FAREED, J. Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisynthetic β -1,3-glucan sulfate. **Thrombosis Research**, v. 78, n. 3. p. 201-210, 1995.

ANDRADE, L.R.; LEAL, R.N.; NOSEDA, M.; DUARTE, M.E.R.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A.S.; FARINA, M.; FILHO, G.M.A. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 1482-1488, 2010.

ANDRADE, A. Albumina. **LaborNews**, v. 232. p.1, 2012.

AQUINO, R.S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A.M.; VALENTE, A.P.; ANDRADE, L.R.; MOURÃO, P.A.S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, v.15, n.01, p. 11-20, 2005.

ARAÚJO, G.S.; FARIAS, W.R.L.; RODRIGUES, J.A.G.; TORRES, V.M.; PONTES, G.C. Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria*

caudata na sobrevivência de pós-larvas de tilápia. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 04, p. 548-554, 2008.

ATHUKORALA, Y.; LEE, K.W.; KIM, S.K.; JEON, Y.J. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 09, p. 1711-1716, 2007.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Química Medicinal, As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos, **Artmed Editora**, Porto Alegre, 2001.

BEADLE, B.M.; BAASE, W.A.; WILSON, D.B.; GILKES, N.R.; SHOICHET, B.K. Comparing the thermodynamic stabilities of a related thermophilic and mesophilic enzyme. **Biochemistry**, v. 38, p. 2570-2576, 1999.

BERNE, B.J.; PECORA, R. Dynamic light scattering - with applications to chemistry, biology and physics, 2000.

BURSON Jr., S.L.; FAHRENBACH, M.J.; FROMMHAGEN, L.H.; RICCARDI, B.A.; BROWN, R.A.; BROCKMAN, J.A.; LEWRY, H.V.; STOKSTAD, E.L.R. Isolation and purification of mactins, heparin-like anticoagulants from Mollusca. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 22, p. 5874-5878, 1956.

CAMILO, M.E.; LOURENÇO, R. Albumina: da fisiopatologia ao uso terapêutico. **Acta Médica Portuguesa**, v. 8, p. 299-305, 1995.

CARTER, D.C.; HO, J.X. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 153-203, 1994.

CARVALHO, P.C.; FISCHER, J.S.; CHEN, E.I.; YATES III, J.R.; BARBOSA, V.C. PatternLab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 316, p. 1-14, 2008.

CARVALHO, P.C.; FISCHER, J.S.; XU, T.; COCIORVA, D.; BALBUENA, T.S.; VALENTE, R.H.; et al. Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. **Proteomics**, v. 12, p. 944-949, 2012. b.

CARVALHO, P.C.; FISCHER, J.S.G.; XU, T.; YATES, J.R.; BARBOSA, V.C. PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. **Curr Protoc Bioinformatics**, Chapter 13: Unit 13, 2012. a

CASU, B.; NAGGI, A.; TORRI, G. Re-visiting the structure of heparin. **Carbohydrate Research**, *in press*, 2014.

CHEN, S.; HU, Y.; YE, X.; LI, G.; YU, G.; XUE, C.; CHAI, W. Sequence determination and anticoagulant and antithrombotic activities of a novel sulfated fucan isolated from the sea cucumber *Isostichopus badionotus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, p. 989-1000, 2012.

CHONG, B.H.; EISBACHER, M. Pathophysiology and laboratory testing of heparin-induced thrombocytopenia. **Semin Hematol**, v. 35, n. 4, p. 3-8, 1998

CIPRIANI, T.R.; MELLINGER, C.G.; BERTOLINI, M.L.C.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARQUES, M.C.A.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI,

M.Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**,v.115, p.687-690, 2009.

Circular Dichroism Spectroscopy. Website disponível em <<http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/cd/>>. Último acesso 14 de maio de 2014.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia.Campinas - SP, **Editora da Unicamp**, 425p., 2006.

COLMAN R.W; CLOWES A.W; GEORGE J.N; HIRSH J & MARDER V.J. **Overview of hemostasis.** In: COLMAN RW; HIRSH J; MARDER VJ; CLOWES AW & GEORGE JN, eds. Hemostasisand thrombosis. Basic principles and clinical practice, 4th ed, Lippincott; Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 3- 16, 2001.

COLMAN, R.W. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? **The Journal of Experimental Medicine.**, v. 203, n. 3, p. 493-495, 2006.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA, Jr., D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.**Revista Brasileira Reumatol**, v. 50, n. 4, p.434-461, 2010.

CUMASHI, A. USHAKOVA, N.A.; PREOBRAZHENS KAYA, M.E.; D'INCECCO, A.; PICCOLI, A.; TOTANI, L.; TINARI, N.; MOROZEVICH, G.E.; BERMAN, A.E.; BILAN, M.I.; USOV, A.I.; USTYUZHANINA, N.E.; GRACHEV, A.A.; SANDERSON, C.J.; KELLY, M.; RABINOVICH, G.A.; IACOBELLI, S.; NIFANTIEV, N.E.; CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO NAZIONALE PER LA BIO-ONCOLOGIA, ITALY. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, p. 541–552, 2007.

DAMONTE, E.; NEYTS, J.; PUJOL, C.A.; SNOECK, R.; ANDREI, G.; IKEDA, S.; WITVROUW, M.; REYMEN, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M.C, *et al.* Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochemical Pharmacology**, v.15, n. 47(12), p. 2187-92, 1994.

DAGUER, H.; BERSOT, LS.; PACHECO, S.; GODOY, RLO. Detecção de soja pelo teor de isoflavonas em lombo injetado de suíno. **Ciência Rural**. v 40, p. 990-993. 2010.

DAMUS P.S.; HICKS, M.; ROSENBERG, R.D. Anticoagulant action of heparin, **Nature**, v. 246, p. 355– 357, 1973.

DAVIE E.W; RATNOFF O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**,v.145, p. 1310-1312, 1964.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C.; BAGGIO. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova na Escola**.,v.7, p.21-25, 1998.

DIAS, J.C. **Determinação de acetato, nitrato, ferro (II), ferro (III) e cobre em etanol combustível por cromatografia de íons.**184 f. Tese (Doutorado em Ciências Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

Dicroísmo Circular (CD). Website disponível em <[http://ca.iq.usp.br/conteudo2.php?itemid=34&alt=Dicroismo+Circular+\(CD\)&c=&paid=16](http://ca.iq.usp.br/conteudo2.php?itemid=34&alt=Dicroismo+Circular+(CD)&c=&paid=16)>. Último acesso 14 de maio de 2014.

DOCTOR, V.M.; SAULS, V. Isolation and anticoagulant properties of a new sulfated xylan: comparison with heparin and a sodium pentosan polysulfate (sp-54). **Thrombosis Research**, v.30, n.6, p. 573-578, 1983.

El enlace peptídico. Website disponível em <<http://www.drosophila.es/blog/author/admin/>>. Último acesso 14 de maio de 2014.

ENGELBERG, H. Heparin, non-heparin glycosaminoglycans and heparinoids: an overview of their application in atherosclerosis. **Semin. Thromb. Haemost.**, v. 17, p. 5-8, 1991.

FARIAS, W.R.L.; NAZARETH, R.A.; MOURÃO, P.A.S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thrombosis and Homeostasis**, v. 86, n.06, p. 1540-1546, 2001.

FARIAS, W.R.L.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, C.M. "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules". **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

FIORAMONTE, M. **Proteômica estrutural por espectrometria de massas: caracterização estrutural de um complexo proteico FAK/Miosina ao nível molecular**. 51 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

FLEMING, S.D.; TSOKOS, G.C. Complement, Natural Antibodies, Autoantibodies and Tissue Injury. **Autoimmunity Reviews**, v. 5, p. 89-92, 2006.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. In: SIMPÓSIO: HEMOSTASIA E TROMBOSE, 34., 2001, Ribeirão Preto. Anais...Ribeirão Preto: USP - Faculdade de Medicina, 2001. p.229-237.

GÓMES-ORDÓÑEZ, V.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Bioactivity of sulfated polysaccharides from the edible red seaweed *Mastocarpus stellatus*. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 3, p. 29-40, 2014,

GRACHER, A.H.P. **Avaliação do potencial anticoagulante e antitrombótico de polissacarídeos nativos e quimicamente sulfatados de basidiomicetos**. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GRACHER, A.H.P.; CIPRIANI, T.R.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. . Antithrombin and heparin cofactor II-mediated inactivation of α_2 -thrombin by a synthetic, sulfated mannogalactan. **Thrombosis Research**, v. 126, p. 180-187, 2010.

GREINACHER, A.; VÖLPEL, H.; JANSSENS, U.; HACH-WUNDERLE, V.; KEMKES-MATTHES, B.; EICHLER, P.; MUELLER-VELTEN, H.G.; PÖTZSCH, B. Recombinant hirudin (lepirudin) provides safe and effective anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia. A prospective study. **Circulation**, v. 99, p. 73-80, 1999.

HAI MOHAMMADI, S.; ENJOJI, K.; PRINCIVALLE, M.; CHRISTI, P.; LECH, M.; BEELER, D.; RAYBURN, H.; SCHWARTZ, J.J.; BARZEGAR, S.; AGOSTINI, A.I.; POST, M.J.; ROSENBERG, R.D.; SHWORAK, N.W. Normal levels of anticoagulant heparan sulfate are not essential for normal hemostasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p.989–999, 2003.

HAN, L.Y.; LIN, H.H.; LI, Z.R.; ZHENG, C.J.; CAO, Z.W.; XIE, B.; CHEN, Y.Z. PEARLS: program for energetic analysis of receptor-ligand system. *J Chem Inf Model*, v. 46, n. 1, p. 445-50, 2006.

HIRST, J.D.; COLELLA, K.; GILBERT, A.T.B. Electronic circular dichroism of proteins from first principles calculations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, p. 11813-11819, 2003.

HU, T.; LIU, D.; CHEN, Y.; WU, J.; WANG, S. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p.193–198, 2010.

JENNY N.S & MANN K.G. **Coagulation cascade: an overview**. In: LOSCALZO J & SCHAFER A.I, eds. Thrombosis and hemorrhage, 2nd ed, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 3-27, 1998.

JUERGENS, C.P.; SEMSARIAN, C.; KEECH, A.C.; BELLER, E.M.; HARRIS, P.J. Hemorrhagic Complications of Intravenous Heparin Use. **The American Journal of Cardiology**, v. 80, p. 150-154, 1997.

JUNQUEIRA, D.R.G.; CARVALHO, M.G.; PERINI, E. Heparin-induced thrombocytopenia: a review of concepts regarding a dangerous adverse drug reaction. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.59, n. 2, p.161–166, 2013.

KENDALL, F.E. Studies on human serum proteins. II Crystallization of human serum albumin. *J. Biol. Chem.* v. 138, p. 97-109, 1941.

KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structure and interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 443-475, 1991.

KLOAREG, B., QUATRANO, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanography Marine Biological Annual Review**, v. 26, p. 259-315, 1998.

KOCH, M.; VACHETTE, P. SVERGUN, D. Small-angle scattering: view on the properties structures and structural changes of biological macromolecules in solution. **Quarterly Reviews Biophysics**, v. 39, p. 147-227, 2003.

KOLLER, F. The physiological function of heparin. **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, v. 33 n. 01, p. 17-19, 1975

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LI, H.; MAO, W.; HOU, Y.; GAO, Y.; QI, X.; ZHOU, C.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; LI, N.; WANG, C. Preparation, structure and anticoagulant activity of a low molecular weight fraction produced by mild acid hydrolysis of sulfated rhamnan from *Monostroma latissimum*. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 414–418, 2012.

LIMA, P.C.W.C. **Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum shroederi* sobre o aumento da resistência do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* submetido a situações de estresse**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

LINDAHL, U.; BÄCKSTRÖM, G.; HÖÖK, M.; THUNBERG, L.; FRANSSON, L.A.; LINKER, A. Structure of the antithrombin-binding site in heparin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 3198–3202, 1979.

LINHARDT, R. J.; TOIDA, T. Heparin oligosaccharides: new analogues development and applications. In: WITEZAK, Z. J.; NIEFORTH, K. A. **Carbohydrate in drug design**. New York: Marcel Dekker, p. 277-341, 1997.

LINS, K.O.A.L.; BEZERRA, D.P.; ALVES, A.P.; ALENCAR, N.M.; LIMA, M.W.; TORRES, V.M.; FARIAS, W.R.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 01, p. 20-26, 2009.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros, determinação de peso molecular e análise termica. **Ed. e-papers**. Rio de Janeiro, 2001.

MAAS, N.C.; GRACHER, A.H.P.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T.R. Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1081-1087, 2012.

MACFARLANE R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, p. 498-499, 1964.

MARTINICHEN-HERRERO, J.C.; CARBONERO, E.R.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, p. 97–102, 2005.

MATHEWS, M.B. Polyanionic proteoglycans. In: KLEINZELLER; SPRINGER, G.F.; WITMANN, H.G. **Connective tissue: macromolecular structure and evolution**. Berlin: Springer-Verlag, p. 93-125, 1975.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. An anticoagulant proteoglycan from the marine green alga, *Codium pugniformis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 9–14, 2000.

MELO, F.R.; PEREIRA, M.S.; MONTEIRO, R.Q.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P.A.S. Sulfated galactan is a catalyst of antithrombin-mediated inactivation of α -thrombin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 1047–1053, 2008.

MENEGATTI, A.C.O. **Análise proteômica de proteínas citoplasmáticas de *Mycoplasma synoviae***. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MORI, S. e BARTH, H. G. Size Exclusion Chromatography. Berlim. 1st Edição. Editora **Springer Verlag Pod**, 1999, 248p.

MOURÃO, P.A.S.; PEREIRA, M.S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends Cardiovascular Medicine**, v. 09, n.08, p. 225-232, 1999.

MULLOY, B.; MOURÃO, P.A.S.; GRAY, E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **Journal of Biotechnology**, v. 77, p. 123-135, 2000.

NADER, H.B.; PINHAL, M.A.S.; BAÚ, E.C.; CASTRO, R.A.B.; MEDEIROS, G.F.; CHAVANTE, S.F.; LEITE, E.L; TRINDADE, E.S.; SHINJO, S.K.; ROCHA, H.A.O.; TERSARIOL, I.L.S.; MENDES, A.; DIETRICH, C.P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v.34, p.699-709, 2001.

NAIR, R.; CHABHADIYA, R.; CHANDA, S. Marine algae: screening for a potent antibacterial agent. **J. Herb. Pharmacol.**, v. 7, n. 01, p. 73-86, 2007.

NIESEN, F.H., BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v. 2, p. 2212-2221, 2007.

O'NEILL, A.N. Sulphated derivatives of laminarin. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 3, p. 1097-1101, 1955.

Orbitrap - High Resolution, High Mass Accuracy - LC/MS. Website disponível em <<http://departments.agri.huji.ac.il/zabam/orbitrap.html>>. Último acesso em 28 de outubro de 2014.

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. **The polysaccharides**. New York: Academic Press, p.195-285, 1983.

PANTOLIANO, M.W., PETRELLA, E.C.; KWASNOSKI, J.D.; LOBANOV, V.S.; MYSLIK, J.; GRAF, E.; CARVER, T.; ASEL, E.; SPRINGER, B.A.; LANE, P.; SALEMME, F.R. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 6, p. 429-440, 2001.

PENGZHAN, Y.; NING, L.; XIGUANG, L.; ZHOU, G.; QUANBIN, Z.; PENGCHENG, L. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa*. **Pharmacological Research**, v.48, n.6, p.543-549, 2003.

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. New York: Academic Press, 219 p., 1967.

PEREIRA, M.S.; VILELA-SILVA, A.C.E.S.; VELENTE, A.P, MOURÃO, P.A.S. A 2-sulfated, 3-linked -L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 2231–2238, 2002.

PEREIRA, M.G.; BENEVIDES, N.M.B.; MELO, M.R.S.; VALENTE, A.P.; MELO, F.R.; MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research**, v.340, p.2015–2023, 2005.

PERRINAUD, A.; JACOBI, D.; MACHET, M.C.; GRODET, C.; GRUEL, Y.; MACHET, L. Bullous hemorrhagic dermatosis occurring at sites distant from subcutaneous injections of heparin: Three cases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, p. S5-S7, 2006.

PINHO, R.T. **Purificação de albumina humana por cromatografia de troca iônica para estudos imunoquímicos**. 44 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1977.

POMIN, V.H. An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. **Biopolymers**, v.91, p. 601-609, 2009.

PROST, D. Heparin fractions and analogues: a new therapeutic possibility for thrombosis. **Carbohydrate Research**, v. 165, p. 496-500, 1986.

Protein Purification by Ion-Exchange Chromatography. Website disponível em <<http://www.reachdevices.com/Protein/ProteinPurification.html>>. Último acesso 14 de maio de 2014.

Proteína. Website disponível em <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Prote%C3%Adna>>. Último acesso 14 de maio de 2014.

QI, XIAOHUI, MAO, W.; GAO, Y.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; ZHAO, C.; LI, N.; WANG, C.; YAN, M.; LIN, C.; SHAN, J. Chemical characteristic of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide from *Enteromorpha clathrata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p.1804–1810, 2012.

RAGAZZI, M.; FERRO, D.R.; PERLY, B.; SINAY, P.; PETITOU, M.; CHOY, JEAN. Conformation of the pentasaccharide corresponding to the binding site of heparin for antithrombin III. **Carbohydrate Research**, v. 195. p. 169-185, 1990.

RICHARDS, M.W.; O'REGAN, L.; MAS-DROUX, C.; BLOT, J.M.; CHEUNG, J.; HOELDER, S.; FRY, A.M.; BAYLISS, R. An autoinhibitory tyrosine motif in the cell-cycleregulated Nek7 kinase is released through binding of Nek9. **Molecular Cell**, v.36, n.4, p. 560-570, 2009.

ROBINSON, J.A.; LEWIS, B.E. Plasmapheresis in the management of heparin-induced thrombocytopenia. **Seminars in Hematology**, v. 36, n. 1, p. 29-32, 1999.

ROCHA, H.A.O.; FARIAS, E.H.C.; BEZERRA, L.C.L.M.; ALBUQUERQUE, I.L.; MEDEIROS, V.P.; QUEIROZ, K.C.S.; LEITE, E.L. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. **Infarma**, v.16, p.82-87, 2004.

RODRIGUES, J.A.G. **Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e seu efeito imunoestimulante no camarão marinho *Litopenaeus vannamei***. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Avaliação comparativa dos polissacarídeos sulfatados extraídos de rodofíceas *halymenia* spp.: ferramenta taxonômica para algas. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v.4, p.7-20, 2009.

ROMÃO, W. **Novas aplicações de espectrometria de massas em química forense**. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SALINA, S.R.A. Einstein e a teoria do movimento browniano. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v.27, p. 263 - 269, 2005.

SANT'ANNA, C.M.R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 01, n. 01, p. 49-57, 2009.

SCHINDEWOLF, M.; LINDHOFF-LAST, E.; LUDWIG, R.J.; BOEHNCKE, WH. Heparin-induced skin lesions. **Lancet**, v. 380, p. 1867-1879, 2012.

SIÈ, P.; OFUSO, F.; FERNANDEZ, F.; BUCHNAN, M.R.; PETITOU, M.; BONEU, B. Respective role of antithrombin II and heparin cofactor II in the in vitro anticoagulant effects of heparin and various sulfated polysaccharides. **British Journal of Haematology**, v. 64, p.707-714, 1989

SINHA, S.; ASTANI, A.; GHOSH, T.; SCHNITZLER, P.; RAY, B. Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: Structural features, chemical modification and anti-viral activity. **Phytochemistry**, v. 71, p. 235–242, 2010.

SOUZA, L.M. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SOUZA, M.L.; DELLIAS, J.M.; MELO, F.R.; SILVA, L.C. Structural composition and anticoagulant activity of dermatan sulfate from the skin of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v.147, n. 03, p. 387-394, 2007.

SOUZA, T.A.C.B.; BARBOSA, J.A.R.G. Development Cloning, Overexpression, Purification and Preliminary Characterization of Human Septin 8. **Protein J.**, v.29, p.328-335, 2010.

SOUZA, T.A.C.B.; OKAMOTO, D.N.; RUIZ, D.M.; OLIVEIRA, L.C.G.; KONDO, M.Y.; TERSARIO, I.L.S.; CASTRO, R.E.; GOUVEA, I.E.; MURAKAMI, M.T. Correlation between catalysis and tertiary structure arrangement in an archaeal halophilic subtilase. **Biochimie**, v. 94, p.798-805, 2012.

SREERAMA, N.; WOODY, R.W.; Computation of analyses of protein circular dichroism spectra. **Methods in Enzymology**, v. 383, p. 318-351, 2004.

STEVEN, A.B.; GOLDBERGER, S.Z. Heparin-Induced Thrombocytopenia. **Journal of the American Heart Association**, v. 114, p. e355-e356, 2006.

SVERGUN, D.; KOCH, M. Small-angle scattering studies of biological macromolecules. **Reports on Progress in Physics**, v. 66, p. 1735-1782, 2003.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T. "Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry". **Rapid Commun Mass Spectrom.** v.2, n. 20, p. 151–153, 1988.

Thermal Shift Assay: Monitoring solution-dependent. In: **Protein Crystallography**. Website disponível em <http://www.beta-sheet.org/resources/T15-Maksel_Protein-Stability.pdf>. Último acesso em 28 de outubro de 2014.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M.H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.

VASCONCELOS, A.F.D.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; CARBONERO, E.R.; SILVEIRA, J.L.M.; GLAUSER, B.; PEREIRA, M.S.; SILVA, M.L.C. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular α -(1→6)-d-glucan(*lasiodiplodan*). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1908–1914, 2013.

VENKATESWARLU, S.; PANCHAGNULA, G.K.; GOTTUMUKKALA, A.L.; SUBBARAJU, G.V. Synthesis, structural revision, and biological activities of 4'-chloroaurone, a metabolite of marine brown alga *Spatoglossum variabile*. **Tetrahedron**, v.63, n. 29, p. 6909-6914, 2007.

VIANA, G.S.B. VIANA, G.S.; FREITAS, A.L.; LIMA, M.M.; VIEIRA, L.A., ANDRADE, M.C.; BENEVIDES N.M. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz and *B. triquetrum* (S. G. Gmel) M Howe. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 713-722, 2002.

VIEIRA, L.A.P.; FREITAS, A.L.P.; FEITOSA, J.P.A.; SILVA, D.C.; VIANA, G.S.B. The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 07, p. 1071-1079, 2004.

VITORINO, R.N.L. **Uso de polissacarídeo extraído do exsudato de cajueiro (*anacardium occidentale* L.) na terapêutica tópica de feridas**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

WALENGA, J.M.; BICK, R.L. Heparin-induced thrombocytopenia, paradoxical thromboembolism, and other side effects of heparin therapy. **Medical Clinics of North America**, v.82, n. 3, p. 635-58, 1998.

WALENGA, J.M.; FRENKEL, E.P.; BICK, R.L. Heparin-induced thrombocytopenia, paradoxical thromboembolism, and other adverse effects of heparin-type therapy. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 17, p. 259 – 282, 2003.

YIN, E.T.; WESSLER, S. Bovine Thrombin and Activated Factor X: separation and purification. **The journal of biological chemistry**, v. 243, p.112-117, 1968.

ZACHARSKI, L.R.; ORNSTEIN, D.L. Heparin and cancer. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 17, p. 289-297, 1998.

ZHANG, H.J.; MAO, W.J.; FANG, F.; LI, H.Y.; SUN, H.H.; CHEN, Y.; QI, X.H. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 03, p. 428-434, 2008.

ZHOU, G.; SUN Y.; XIN, H.; ZHANG Y.; LI, Z.; XU, Z. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambdacarrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v.50, n. 01, p.47-53, 2004.

ZYBAILOV, B.; MOSLEY, A.L.; SARDIU, M.E.; COLEMAN, M.K.; FLORENS, L.; WASHBURN, M.P. Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 2339-2347, 2006.

ANEXO I

Proteínas detectadas em GF_pl 1			
Proteínas	%	[prot] em ng - sem fluorescência	[prot] em ng - com fluorescência
Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2	7,377130263	71,85324876	119,8045955
Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3	7,271196623	70,82145511	118,0842332
Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2	6,487201408	63,18534172	105,3521509
Ig kappa chain V-II region RPMI 6410 OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	4,973610969	48,44297084	80,77144213
Ig kappa chain V-III region HAH OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4,909317971	47,81675703	79,72732384
Ig kappa chain V-IV region B17 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	4,685945967	45,64111372	76,09976251
Ig kappa chain V-I region AU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	4,502619357	43,85551254	73,12253836
Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGG PE=1 SV=3	4,466884868	43,50745862	72,54221026
Ig kappa chain V-II region GM607 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	4,192732817	40,83721763	68,08998094
Pregnancy zone protein OS=Homo sapiens GN=PZP PE=1 SV=4	4,019879312	39,1536245	65,28284003
Ig kappa chain V-III region HIC OS=Homo sapiens PE=2 SV=2	3,956763738	38,5388788	64,2578431
Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3	3,635849542	35,41317454	59,04619657
Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1	2,827707487	27,54187092	45,92196958
Ig mu heavy chain disease protein OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	2,715359117	26,4475978	44,09743206
Haptoglobin-related protein OS=Homo sapiens GN=HPR PE=1 SV=2	2,412116982	23,4940194	39,17277979
Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	2,351076506	22,89948517	38,18148246
Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	1,860450302	18,12078595	30,21371291

Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1	1,854597593	18,06378056	30,11866491
Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	1,805707536	17,5875914	29,32469038
Immunoglobulin J chain OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=4	1,551528019	15,11188291	25,19681503
Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3	1,465195911	14,27100817	23,79478159
Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2	1,334358539	12,99665217	21,66998268
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITIH2 PE=1 SV=2	1,163307561	11,33061565	18,89211479
Ig gamma-3 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG3 PE=1 SV=2	1,012187596	9,858707189	16,43792657
Ig lambda-3 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC3 PE=1 SV=1	0,981894098	9,563648513	15,94596015
Complement C1q subcomponent subunit B OS=Homo sapiens GN=C1QB PE=1 SV=3	0,890506288	8,673531241	14,46182211
Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1	0,887535516	8,644595923	14,41357678
Complement C1q subcomponent subunit C OS=Homo sapiens GN=C1QC PE=1 SV=3	0,852511061	8,30345773	13,84477962
Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	0,844428926	8,224737735	13,71352575
Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1	0,728194784	7,092617196	11,82588329
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=2 SV=2	0,597476867	5,819424685	9,70302432
Ig lambda chain V-III region LOI OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,563215402	5,485718014	9,146618125
Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2	0,542261953	5,281631426	8,806334124
Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1	0,515070415	5,016785843	8,364743542

Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2	0,513282787	4,999374342	8,335712455
Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=1	0,473502356	4,61191295	7,689678265
Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=2	0,456699598	4,44825408	7,416801464
Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 SV=2	0,454735481	4,429123589	7,384904218
Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1	0,408295016	3,976793455	6,630711059
Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1	0,385139437	3,751258116	6,254664456
Plasma protease C1 inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPING1 PE=1 SV=2	0,383972619	3,739893313	6,23571534
Serum amyloid A-4 protein OS=Homo sapiens GN=SAA4 PE=1 SV=2	0,369753632	3,601400372	6,004798977
Antithrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	0,327010474	3,185082019	5,310650101
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 OS=Homo sapiens GN=ITIH1 PE=1 SV=3	0,320362911	3,120334757	5,202693681
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	0,319858721	3,115423942	5,194505629
Ig lambda chain V region 4A OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,306732512	2,987574663	4,981335988
Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1	0,289572179	2,820433022	4,702652185
Ig kappa chain V-I region AG OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,271081893	2,640337638	4,402369942
Ig kappa chain V-IV region JI OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,214492134	2,089153385	3,483352255
C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens GN=C4BPA PE=1 SV=2	0,206804355	2,014274414	3,35850272
Vitamin K-dependent protein S OS=Homo sapiens GN=PROS1 PE=1 SV=1	0,204145434	1,988376523	3,315321841
Ig kappa chain V-IV region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGKV4-1 PE=4 SV=1	0,198603828	1,934401282	3,225326162
Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens GN=APOB PE=1 SV=2	0,189795545	1,848608604	3,082279644

Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2	0,165981831	1,616663037	2,69554494
Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1	0,160174899	1,560103519	2,601240365
Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4 PE=1 SV=3	0,155573557	1,515286447	2,526514568
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4 PE=1 SV=4	0,137888142	1,343030501	2,239303422
Heparin cofactor 2 OS=Homo sapiens GN=SERPIND1 PE=1 SV=3	0,132980196	1,295227113	2,159598389
Apolipoprotein C-I OS=Homo sapiens GN=APOC1 PE=1 SV=1	0,130958374	1,275534561	2,12676399
Pigment epithelium-derived factor OS=Homo sapiens GN=SERPINF1 PE=1 SV=4	0,126560699	1,232701208	2,055345751
Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2	0,123606374	1,409112667	2,365826004
Platelet factor 4 OS=Homo sapiens GN=PF4 PE=1 SV=2	0,123570554	1,203577191	2,006785789
Angiotensinogen OS=Homo sapiens GN=AGT PE=1 SV=1	0,116075961	1,130579861	1,885073609
Lumican OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2	0,114017542	1,110530856	1,851644877
Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2	0,103621238	1,009270858	1,682808904
Serum amyloid P-component OS=Homo sapiens GN=APCS PE=1 SV=2	0,096604389	0,940926751	1,568855281
Complement C1r subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1R PE=1 SV=2	0,091991164	0,895993939	1,493936506
Complement factor H OS=Homo sapiens GN=CFH PE=1 SV=4	0,091153937	0,887839345	1,480339934
Complement component C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2	0,07893614	0,768838008	1,28192292
Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2	0,073630506	0,71716113	1,19575942
Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1S PE=1 SV=1	0,07207243	0,701985466	1,170456259
CD5 antigen-like OS=Homo sapiens GN=CD5L PE=1 SV=1	0,069644069	0,678333228	1,131019674

Ig kappa chain V-I region WEA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,063316016	0,616697999	1,028252106
Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens GN=APOC3 PE=1 SV=1	0,056124786	0,546655416	0,911466526
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=Homo sapiens GN=ITIH3 PE=1 SV=2	0,055204087	0,537687809	0,896514375
Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3	0,054261271	0,528504775	0,881203034
Ig heavy chain V-II region WAH OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,050165313	0,488610152	0,814684689
Mannose-binding protein C OS=Homo sapiens GN=MBL2 PE=1 SV=2	0,04736874	0,461371524	0,769268332
Ig heavy chain V-III region GAL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,047092405	0,458680028	0,764780662
Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1	0,04144688	0,403692615	0,673097337
Actin, alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA1 PE=1 SV=1	0,04144688	0,403692615	0,673097337
Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	0,041336649	0,402618964	0,671307184
Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1	0,041227003	0,401551009	0,669526529
Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTG2 PE=1 SV=1	0,041227003	0,401551009	0,669526529
Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1	0,041227003	0,401551009	0,669526529
Ig kappa chain V-III region VG (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,037720184	0,367394594	0,612575791
Ig lambda chain V-I region WAH OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,03763173	0,366533047	0,61113929
Apolipoprotein C-II OS=Homo sapiens GN=APOC2 PE=1 SV=1	0,037529781	0,365540069	0,609483646
Ficolin-3 OS=Homo sapiens GN=FCN3 PE=1 SV=2	0,035214649	0,34299068	0,571885898
Ceruloplasmin OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1	0,034174579	0,332860403	0,554995168
Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=1 SV=3	0,032616093	0,317680748	0,529685354

Ig heavy chain V-III region VH26 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,031004485	0,301983685	0,503512838
Ig lambda-7 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGLC7 PE=1 SV=2	0,029431158	0,286659478	0,477962004
Transthyretin OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1	0,028957595	0,282046977	0,470271345
Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit OS=Homo sapiens GN=IGFALS PE=1 SV=1	0,02742092	0,267079763	0,445315745
Ig kappa chain V-III region SIE OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,026355628	0,25670382	0,428015405
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	0,026348769	0,256637006	0,427904002
Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2	0,025589891	0,249245534	0,415579823
Ig kappa chain V-I region HK101 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,025317874	0,246596097	0,411162281
Plasma kallikrein OS=Homo sapiens GN=KLKB1 PE=1 SV=1	0,024059192	0,234336529	0,390721276
Thyroxine-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SERPINA7 PE=1 SV=2	0,023536309	0,229243645	0,382229651
Ig heavy chain V-III region TUR OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,021477662	0,209192426	0,348797227
Ig kappa chain V-I region Ka OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,017880092	0,1741521	0,290372701
Lipopolysaccharide-binding protein OS=Homo sapiens GN=LBP PE=1 SV=3	0,017323084	0,16872684	0,281326886
Complement component C8 beta chain OS=Homo sapiens GN=C8B PE=1 SV=3	0,016016577	0,15600146	0,26010921
Ig heavy chain V-III region BRO OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,015892563	0,154793566	0,258095227
Complement C5 OS=Homo sapiens GN=C5 PE=1 SV=4	0,013864329	0,135038564	0,225156702
C4b-binding protein beta chain OS=Homo sapiens GN=C4BPB PE=1 SV=1	0,013670253	0,133148263	0,222004906
Complement C2 OS=Homo sapiens GN=C2 PE=1 SV=2	0,013187738	0,128448566	0,214168862

Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	0,01266265	0,123334212	0,205641437
Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS=Homo sapiens GN=PON1 PE=1 SV=3	0,011518481	0,112190005	0,187060132
Histidine-rich glycoprotein OS=Homo sapiens GN=HRG PE=1 SV=1	0,010403241	0,101327569	0,168948637
Complement C1q subcomponent subunit A OS=Homo sapiens GN=C1QA PE=1 SV=2	0,009877795	0,096209725	0,160415394
Carboxypeptidase N catalytic chain OS=Homo sapiens GN=CPN1 PE=1 SV=1	0,00904735	0,088121187	0,146928961
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	0,008843158	0,086132359	0,143612887
Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	0,008820305	0,085909775	0,14324176
Ficolin-2 OS=Homo sapiens GN=FCN2 PE=1 SV=2	0,008816536	0,085873063	0,143180548
Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4	0,008548832	0,083265622	0,13883303
Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,007509573	0,073143242	0,121955467
Plasminogen OS=Homo sapiens GN=PLG PE=1 SV=2	0,007046651	0,068634384	0,114437618
Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2	0,007028997	0,068462434	0,114150917
Complement component C7 OS=Homo sapiens GN=C7 PE=1 SV=2	0,006735387	0,065602672	0,10938269
Ig heavy chain V-I region V35 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,006612383	0,064404609	0,107385097
Carboxypeptidase N subunit 2 OS=Homo sapiens GN=CPN2 PE=1 SV=3	0,006439345	0,062719217	0,104574958
Apolipoprotein L1 OS=Homo sapiens GN=APOL1 PE=1 SV=5	0,0056388	0,054921909	0,091574107
Ig heavy chain V-I region HG3 OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,005565078	0,05420386	0,090376868

Kallistatin OS=Homo sapiens GN=SERPINA4 PE=1 SV=3	0,005037091	0,049061264	0,081802354
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase OS=Homo sapiens GN=PGLYRP2 PE=1 SV=1	0,004612464	0,044925396	0,074906409
Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1	0,004600587	0,044809722	0,074713541
Coagulation factor XIII A chain OS=Homo sapiens GN=F13A1 PE=1 SV=4	0,004142665	0,04034956	0,067276885
Properdin OS=Homo sapiens GN=CFP PE=1 SV=2	0,003908365	0,038067473	0,063471844
Complement factor I OS=Homo sapiens GN=CFI PE=1 SV=2	0,003500232	0,034092263	0,056843774
Apolipoprotein D OS=Homo sapiens GN=APOD PE=1 SV=1	0,003010029	0,029317682	0,048882871
Ig kappa chain V-I region Roy OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,00300523	0,029270938	0,048804931
Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	0,002926473	0,028503851	0,047525929
Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2	0,002456741	0,023928662	0,039897481
PTB domain-containing engulfment adapter protein 1 OS=Homo sapiens GN=GULP1 PE=1 SV=1	0,002427357	0,023642459	0,03942028
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	0,002365232	0,023037359	0,038411367
Mannan-binding lectin serine protease 1 OS=Homo sapiens GN=MASP1 PE=1 SV=3	0,002282119	0,022227841	0,037061615
Complement component C6 OS=Homo sapiens GN=C6 PE=1 SV=3	0,001443139	0,014056172	0,023436574
Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=LRG1 PE=1 SV=2	0,001423123	0,013861217	0,023111516
IgGFc-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3	0,001030331	0,01003542	0,01673257
Glutathione peroxidase 3 OS=Homo sapiens GN=GPX3 PE=1 SV=2	0,001021538	0,009949781	0,016589779

Ig kappa chain V-I region HK102 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGKV1-5 PE=4 SV=1	0,001008382	0,009821643	0,016376127
Coagulation factor V OS=Homo sapiens GN=F5 PE=1 SV=4	0,000801539	0,007806989	0,013016992
von Willebrand factor OS=Homo sapiens GN=VWF PE=1 SV=4	0,000795245	0,007745684	0,012914774
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=CHD1 PE=1 SV=2	0,00070362	0,006853263	0,011426796
Coagulation factor XIII B chain OS=Homo sapiens GN=F13B PE=1 SV=3	0,000536296	0,005223528	0,008709455
Platelet glycoprotein Ib alpha chain OS=Homo sapiens GN=GP1BA PE=1 SV=2	0,000405276	0,003947391	0,006581686
Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens GN=THBS1 PE=1 SV=2	0,000265767	0,002588568	0,004316052
Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens GN=LGALS3BP PE=1 SV=1	0,000200176	0,001949712	0,003250855
Transferrin receptor protein 1 OS=Homo sapiens GN=TFRC PE=1 SV=2	9,18E-05	0,000893962	0,001490549
Ig delta chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHD PE=1 SV=2	7,73E-05	0,000753004	0,001255523
Proteoglycan 4 OS=Homo sapiens GN=PRG4 PE=1 SV=2	2,44E-05	0,000237399	0,000395827
E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6 OS=Homo sapiens GN=RBBP6 PE=1 SV=1	1,99E-05	0,000194277	0,000323929

Proteínas detectadas em GF_pl 2			
Proteínas	%	[prot] em ng - sem fluorescência	[prot] em ng - com fluorescência
Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2	8,696662178	84,74027626	141,2337938
Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	7,661490632	74,65356472	124,4226079
Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3	7,004902098	68,25576604	113,7596101

Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	5,897156033	57,46188838	95,76981397
Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1	4,679340808	45,59549683	75,99249472
Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	4,655851759	45,36661954	75,61103257
Ig gamma-3 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG3 PE=1 SV=2	4,655360591	45,3618336	75,60305599
Complement factor H OS=Homo sapiens GN=CFH PE=1 SV=4	3,962550225	38,6110894	64,35181566
Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGG PE=1 SV=3	3,906112841	38,06116352	63,43527253
Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3	3,293881365	32,09558002	53,49263337
Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2	2,952941104	28,77345812	47,95576353
Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1	2,64865825	25,80852598	43,01420997
Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2	2,499660017	24,3566872	40,59447867
Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	2,372700418	23,11959288	38,53265479
Haptoglobin-related protein OS=Homo sapiens GN=HPR PE=1 SV=2	2,179670316	21,23870756	35,39784593
Ig lambda-7 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGLC7 PE=1 SV=2	2,151485132	20,96407113	34,94011854
Ig lambda-3 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC3 PE=1 SV=1	2,144426439	20,89529122	34,82548536
Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3	1,972773775	19,22270767	32,03784611
Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1	1,945690957	18,95881269	31,59802114
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITIH2 PE=1 SV=2	1,703133914	16,59533686	27,65889477
Immunoglobulin J chain OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=4	1,438458516	14,01633978	23,3605663

Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2	1,324597009	12,90687325	21,51145542
Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1	1,092791388	10,64815928	17,74693214
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=2 SV=2	1,043563756	10,16848524	16,94747539
Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2	0,842374213	8,208094336	13,68015723
Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2	0,835095002	8,137165701	13,56194283
Ig kappa chain V-II region Cum OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,755817006	7,364680907	12,27446818
Ig kappa chain V-II region TEW OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,742897057	7,238788926	12,06464821
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	0,740301482	7,21349764	12,02249607
Pregnancy zone protein OS=Homo sapiens GN=PZP PE=1 SV=4	0,714886605	6,965855081	11,60975847
Ig kappa chain V-II region GM607 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,653525983	6,367957176	10,61326196
Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1	0,621799373	6,058813091	10,09802182
Ig kappa chain V-III region VG (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,545687301	5,317177063	8,861961772
Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens GN=HBD PE=1 SV=2	0,54512889	5,311735904	8,852893173
Ig mu heavy chain disease protein OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,544051759	5,301240335	8,835400559
Platelet factor 4 OS=Homo sapiens GN=PF4 PE=1 SV=2	0,529387869	5,158355396	8,597258993
Complement C1q subcomponent subunit B OS=Homo sapiens GN=C1QB PE=1 SV=3	0,477133889	4,649192613	7,748654356
Antithrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	0,454141988	4,42515953	7,375265884
Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,398314523	3,881176709	6,468627848

Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1	0,393557796	3,834827159	6,391378599
Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 SV=2	0,366672043	3,57285239	5,954753984
Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=2	0,362760915	3,534742357	5,891237261
Ig kappa chain V-III region VH (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,347808352	3,38904458	5,648407634
Ig kappa chain V-III region CLL OS=Homo sapiens PE=1 SV=2	0,34461745	3,357952428	5,59658738
Ig lambda chain V region 4A OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,324664271	3,163528652	5,272547754
Ig kappa chain V-III region POM OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,323821569	3,155317368	5,25886228
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 OS=Homo sapiens GN=ITIH1 PE=1 SV=3	0,315167183	3,070989033	5,118315055
Complement C1q subcomponent subunit C OS=Homo sapiens GN=C1QC PE=1 SV=3	0,299909502	2,922318192	4,870530319
Plasma protease C1 inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPING1 PE=1 SV=2	0,295997407	2,884198737	4,806997894
Ig kappa chain V-I region Lay OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,291188388	2,837339649	4,728899414
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4 PE=1 SV=4	0,27930838	2,721580852	4,535968086
Ig kappa chain V-I region AG OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,268595379	2,617193372	4,361988953
Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=1	0,256150691	2,495932337	4,159887229
Mannose-binding protein C OS=Homo sapiens GN=MBL2 PE=1 SV=2	0,25201346	2,455619155	4,092698591
Heparin cofactor 2 OS=Homo sapiens GN=SERPIND1 PE=1 SV=3	0,227130699	2,213161532	3,688602553
Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1	0,219980254	2,143487596	3,572479326
Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1	0,205599955	2,003365957	3,338943262
Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2	0,194807207	1,785992478	2,976654131

Complement C1r subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1R PE=1 SV=2	0,187231511	1,824383838	3,040639731
Ig kappa chain V-IV region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGKV4-1 PE=4 SV=1	0,177521762	1,729772051	2,882953419
Ig kappa chain V-IV region JI OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,161504761	1,573702392	2,622837321
Angiotensinogen OS=Homo sapiens GN=AGT PE=1 SV=1	0,146884242	1,431240051	2,385400085
Ficolin-3 OS=Homo sapiens GN=FCN3 PE=1 SV=2	0,130597578	1,272542796	2,12090466
Pigment epithelium-derived factor OS=Homo sapiens GN=SERPINF1 PE=1 SV=4	0,119557731	1,164970534	1,941617557
Ig kappa chain V-I region WEA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,110588382	1,077573194	1,795955324
Serum amyloid A-4 protein OS=Homo sapiens GN=SAA4 PE=1 SV=2	0,109597935	1,067922275	1,779870459
Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2	0,104454589	1,017805516	1,696342527
Lumican OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2	0,103544525	1,008937851	1,681563085
Ig kappa chain V-II region RPMI 6410 OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,098414932	0,958955095	1,598258491
C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens GN=C4BPA PE=1 SV=2	0,086878156	0,84654075	1,410901249
Ceruloplasmin OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1	0,081916188	0,798191335	1,330318892
Ig kappa chain V-I region HK101 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,080550244	0,784881578	1,308135963
Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1S PE=1 SV=1	0,077583119	0,755969914	1,259949856
Ig kappa chain V-III region HAH OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	0,075177657	0,732531092	1,220885154

Ig kappa chain V-III region HIC OS=Homo sapiens PE=2 SV=2	0,075177657	0,732531092	1,220885154
Serum amyloid P-component OS=Homo sapiens GN=APCS PE=1 SV=2	0,074019669	0,721247651	1,202079419
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=Homo sapiens GN=ITI3 PE=1 SV=2	0,069098432	0,673295124	1,12215854
Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3	0,06797639	0,662361949	1,103936581
Complement component C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2	0,061545976	0,599703989	0,999506649
Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2	0,060587014	0,590359863	0,983933104
Vitamin K-dependent protein S OS=Homo sapiens GN=PROS1 PE=1 SV=1	0,060517472	0,589682244	0,98280374
CD5 antigen-like OS=Homo sapiens GN=CD5L PE=1 SV=1	0,060458207	0,589104772	0,981841286
Ig heavy chain V-III region BRO OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,059514108	0,579905471	0,966509118
Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens GN=APOB PE=1 SV=2	0,057813707	0,563336761	0,938894602
Ig heavy chain V-III region JON OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,055776918	0,543490285	0,905817142
Ig heavy chain V-III region VH26 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,041327131	0,402691565	0,671152608
Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=1 SV=3	0,038572039	0,375845945	0,626409909
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	0,037507023	0,365468432	0,609114054
Coagulation factor XIII A chain OS=Homo sapiens GN=F13A1 PE=1 SV=4	0,036917409	0,35972323	0,599538716
Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2	0,036721558	0,357814858	0,596358096
Ig lambda chain V-III region LOI OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,036343391	0,354130006	0,590216676
Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4 PE=1 SV=3	0,035690087	0,34776421	0,579607016
Complement C5 OS=Homo sapiens GN=C5 PE=1 SV=4	0,03429288	0,334149821	0,556916369
Ig kappa chain V-I region Roy OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,031894236	0,310777439	0,517962398

Plasminogen OS=Homo sapiens GN=PLG PE=1 SV=2	0,028034263	0,273165854	0,455276424
Coagulation factor XIII B chain OS=Homo sapiens GN=F13B PE=1 SV=3	0,026866743	0,261789544	0,436315906
Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit OS=Homo sapiens GN=IGFALS PE=1 SV=1	0,026560511	0,258805615	0,431342692
Ig heavy chain V-III region TUR OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,025889851	0,252270705	0,420451174
Ig kappa chain V-I region HK102 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGKV1-5 PE=4 SV=1	0,02383917	0,232288877	0,387148128
Properdin OS=Homo sapiens GN=CFP PE=1 SV=2	0,023536541	0,229340052	0,38223342
Thyroxine-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SERPINA7 PE=1 SV=2	0,022352757	0,217805262	0,36300877
Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	0,021750295	0,211934877	0,353224794
Ig delta chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHD PE=1 SV=2	0,019017458	0,185306107	0,308843511
Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS=Homo sapiens GN=PON1 PE=1 SV=3	0,018429189	0,179574016	0,299290027
Ig heavy chain V-III region GAL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,018096883	0,176336027	0,293893378
Plasma kallikrein OS=Homo sapiens GN=KLKB1 PE=1 SV=1	0,017946244	0,174868199	0,291446998
Lipopolysaccharide-binding protein OS=Homo sapiens GN=LBP PE=1 SV=3	0,017586334	0,171361238	0,285602064
Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2	0,016312624	0,158950205	0,264917009
Histidine-rich glycoprotein OS=Homo sapiens GN=HRG PE=1 SV=1	0,013616336	0,132677581	0,221129301
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase OS=Homo sapiens GN=PGLYRP2 PE=1 SV=1	0,011995274	0,116881951	0,194803251
Complement component C7 OS=Homo sapiens GN=C7 PE=1 SV=2	0,011499805	0,112054104	0,186756841

Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4	0,009573243	0,093281681	0,155469469
Transthyretin OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1	0,008725096	0,085017339	0,141695565
Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1	0,008666378	0,084445188	0,14074198
Kallistatin OS=Homo sapiens GN=SERPINA4 PE=1 SV=3	0,008002713	0,077978435	0,129964058
Complement component C6 OS=Homo sapiens GN=C6 PE=1 SV=3	0,007771756	0,075727995	0,126213325
Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=4	0,007256908	0,070711308	0,117852179
Carboxypeptidase N catalytic chain OS=Homo sapiens GN=CPN1 PE=1 SV=1	0,006981623	0,068028931	0,113381552
Complement C2 OS=Homo sapiens GN=C2 PE=1 SV=2	0,006762015	0,065889079	0,109815131
Complement factor I OS=Homo sapiens GN=CFI PE=1 SV=2	0,006474824	0,063090682	0,105151137
Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1	0,006399085	0,062352687	0,103921145
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	0,006014903	0,058609219	0,097682032
Ig heavy chain V-I region V35 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,005970711	0,058178611	0,096964351
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	0,00519181	0,050588992	0,084314986
Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2	0,003934888	0,038341547	0,063902578
Apolipoprotein D OS=Homo sapiens GN=APOD PE=1 SV=1	0,003087328	0,030082927	0,050138211
Tyrosine-protein kinase Fgr OS=Homo sapiens GN=FGR PE=1 SV=2	0,002605767	0,025390591	0,042317651
Coagulation factor X OS=Homo sapiens GN=F10 PE=1 SV=2	0,002240069	0,021827231	0,036378718
Complement component C8 beta chain OS=Homo sapiens GN=C8B PE=1 SV=3	0,002014106	0,019625447	0,032709078
Cholinesterase OS=Homo sapiens GN=BCHE PE=1 SV=1	0,001806097	0,017598613	0,029331022

Carboxypeptidase B2 OS=Homo sapiens GN=CPB2 PE=1 SV=2	0,001355127	0,013204359	0,022007265
Ig lambda chain V-I region WAH OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,000671881	0,006546804	0,010911341
Ig lambda chain V-I region HA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,000653884	0,006371444	0,010619073
Mannan-binding lectin serine protease 1 OS=Homo sapiens GN=MASP1 PE=1 SV=3	0,000415394	0,004047597	0,006745995
Apolipoprotein(a) OS=Homo sapiens GN=LPA PE=1 SV=1	0,00038159	0,003718209	0,006197015
Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=LRG1 PE=1 SV=2	0,000336602	0,00327985	0,005466416
Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens GN=LGALS3BP PE=1 SV=1	0,000275157	0,002681134	0,004468556

Proteínas detectadas em GF_pl 4			
Proteínas	%	[prot] em ng - sem fluorescência	[prot] em ng - com fluorescência
Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	22,94317431	164,273128	197,1277536
Ig gamma-3 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG3 PE=1 SV=2	18,83539226	134,8614086	161,8336903
Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2	16,34453272	117,0268543	140,4322252
Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1	5,604262356	40,12651847	48,15182216
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	5,060222914	36,23119607	43,47743528
Ig lambda chain V-III region LOI OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	3,679439844	26,34478928	31,61374714
Ig kappa chain V-III region IARC/BL41 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	2,587812814	18,52873975	22,23448769
Ig kappa chain V-I region AG OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	2,134187082	15,28077951	18,33693541
Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	1,905707007	13,64486217	16,37383461

Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1	1,562572823	11,18802142	13,4256257
Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	1,427342587	10,21977292	12,2637275
Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1	1,034126246	7,404343919	8,885212703
Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	1,021598052	7,314642052	8,777570462
Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2	0,927308645	6,639529901	7,967435881
Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3	0,884105188	6,330193146	7,596231775
Ig kappa chain V-II region RPMI 6410 OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,845882342	6,056517569	7,267821083
Ig kappa chain V-III region VG (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,772755263	5,532927681	6,639513217
Ig kappa chain V-IV region B17 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	0,74118015	5,306849872	6,368219847
Ig lambda chain V region 4A OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,71286197	5,104091706	6,124910047
Ig kappa chain V-I region AU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,594982852	4,260077218	5,112092662
Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1	0,576203255	4,125615305	4,950738366
Ig kappa chain V-IV region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGKV4-1 PE=4 SV=1	0,550374967	3,940684763	4,728821715
Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2	0,547525093	3,920279667	4,704335601
Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3	0,537531143	3,848722985	4,618467582
Ig kappa chain V-II region GM607 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,499776066	3,578396636	4,294075963
Ig kappa chain V-I region Walker OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,470222674	3,366794346	4,040153216
Ig kappa chain V-III region HIC OS=Homo sapiens PE=2 SV=2	0,457364499	3,274729812	3,929675774
Ig kappa chain V-IV region JI OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,451059183	3,229583753	3,875500503
Ig kappa chain V-III region HAH OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	0,422182614	3,022827518	3,627393022

Ig kappa chain V-I region WEA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,371774623	2,661906299	3,194287559
Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1	0,327446874	2,344519621	2,813423545
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=2 SV=2	0,27688002	1,982460945	2,378953134
Ig kappa chain V-III region GOL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,245046809	1,754535155	2,105442186
Complement factor H OS=Homo sapiens GN=CFH PE=1 SV=4	0,18977839	1,358813276	1,630575931
Ig kappa chain V-III region Ti OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,165093387	1,182068652	1,418482382
Complement component C8 alpha chain OS=Homo sapiens GN=C8A PE=1 SV=2	0,16296098	1,166800615	1,400160739
Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2	0,155879584	1,11609782	1,339317383
Ig heavy chain V-III region VH26 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,15426844	1,104562033	1,32547444
Ig kappa chain V-III region SIE OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,153116074	1,09631109	1,315573309
Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1	0,137388805	0,983703842	1,180444611
Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=2	0,120661278	0,863934749	1,036721699
Ig lambda chain V-I region HA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,120261302	0,86107092	1,033285104
Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 SV=2	0,120258943	0,861054033	1,03326484
Ig lambda chain V-I region WAH OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,117040017	0,83800652	1,005607824
Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1	0,11651035	0,834214104	1,001056925
Ig lambda-3 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC3 PE=1 SV=1	0,11651035	0,834214104	1,001056925
Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2	0,111671487	0,79956785	0,95948142
Ig kappa chain V-I region Roy OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,111586552	0,798959711	0,958751653
Complement component C6 OS=Homo sapiens GN=C6 PE=1 SV=3	0,108612325	0,777664246	0,933197095

Complement component C8 gamma chain OS=Homo sapiens GN=C8G PE=1 SV=3	0,101372944	0,72583028	0,870996336
Antithrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	0,099663863	0,713593258	0,85631191
Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	0,086913056	0,622297481	0,746756977
Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4 PE=1 SV=3	0,086185865	0,617090795	0,740508955
Ig kappa chain V-III region CLL OS=Homo sapiens PE=1 SV=2	0,078669208	0,56327153	0,675925835
Ig kappa chain V-I region HK102 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGKV1-5 PE=4 SV=1	0,077628879	0,555822776	0,666987331
Haptoglobin-related protein OS=Homo sapiens GN=HPR PE=1 SV=2	0,076516356	0,547857107	0,657428528
Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2	0,076485357	0,547635155	0,657162186
Immunoglobulin J chain OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=4	0,074734833	0,535101404	0,642121685
Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3	0,072288754	0,517587478	0,621104973
Complement component C7 OS=Homo sapiens GN=C7 PE=1 SV=2	0,068664755	0,491639649	0,589967579
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4 PE=1 SV=4	0,062999023	0,451073007	0,541287608
Ig heavy chain V-III region WEA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,059339351	0,424869752	0,509843702
Ig heavy chain V-III region BUT OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,058823356	0,421175232	0,505410278
Complement component C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2	0,058397956	0,418129364	0,501755237
Ig heavy chain V-III region BRO OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,056372383	0,403626264	0,484351517
Vitamin K-dependent protein S OS=Homo sapiens GN=PROS1 PE=1 SV=1	0,056363662	0,403563822	0,484276586
Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2	0,055288762	0,395867536	0,475041043

Complement C5 OS=Homo sapiens GN=C5 PE=1 SV=4	0,053851404	0,385576052	0,462691262
Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGG PE=1 SV=3	0,053355542	0,382025678	0,458430813
Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1	0,052801522	0,378058899	0,453670678
Ig heavy chain V-III region GAL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,052103415	0,373060449	0,447672538
Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2	0,050683795	0,362895971	0,435475165
Complement C1q subcomponent subunit B OS=Homo sapiens GN=C1QB PE=1 SV=3	0,044444647	0,318223673	0,381868408
Complement factor I OS=Homo sapiens GN=CFI PE=1 SV=2	0,041171936	0,294791063	0,353749276
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITIH2 PE=1 SV=2	0,035604938	0,254931358	0,30591763
Ig heavy chain V-I region HG3 OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,031716548	0,227090481	0,272508577
Serum amyloid P-component OS=Homo sapiens GN=APCS PE=1 SV=2	0,031003354	0,221984014	0,266380817
Ig heavy chain V-I region WOL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,029926097	0,214270857	0,257125028
Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=1	0,029894384	0,214043786	0,256852544
Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4	0,027644457	0,197934311	0,237521173
Complement C1q subcomponent subunit C OS=Homo sapiens GN=C1QC PE=1 SV=3	0,027286944	0,19537452	0,234449424
Coagulation factor XIII B chain OS=Homo sapiens GN=F13B PE=1 SV=3	0,026641353	0,190752085	0,228902502
Complement C1r subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1R PE=1 SV=2	0,025867188	0,185209068	0,222250881
Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1	0,024926325	0,17847249	0,214166987
Alpha-1-acid glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1	0,024761679	0,177293623	0,212752347

Serum amyloid A-4 protein OS=Homo sapiens GN=SAA4 PE=1 SV=2	0,024650047	0,176494334	0,2117932
Ig heavy chain V-III region JON OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,021688322	0,155288385	0,186346062
Ceruloplasmin OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1	0,020581101	0,147360684	0,17683282
Histidine-rich glycoprotein OS=Homo sapiens GN=HRG PE=1 SV=1	0,019864836	0,142232223	0,170678667
Ig kappa chain V-I region Wes OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,019846633	0,142101891	0,170522269
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 OS=Homo sapiens GN=ITIH1 PE=1 SV=3	0,019143684	0,137068779	0,164482534
Ig heavy chain V-II region WAH OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,018511954	0,132545594	0,159054712
Complement component C8 beta chain OS=Homo sapiens GN=C8B PE=1 SV=3	0,01839821	0,131731186	0,158077423
Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1	0,017949199	0,128516263	0,154219516
Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,017883255	0,128044109	0,153652931
Heparin cofactor 2 OS=Homo sapiens GN=SERPIND1 PE=1 SV=3	0,017557997	0,125715257	0,150858308
Afamin OS=Homo sapiens GN=AFM PE=1 SV=1	0,01693638	0,121264479	0,145517375
Platelet factor 4 OS=Homo sapiens GN=PF4 PE=1 SV=2	0,016567192	0,118621091	0,14234531
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	0,016219401	0,116130908	0,139357089
Ig heavy chain V-II region OU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,015886858	0,113749903	0,136499883
Beta-2-glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=APOH PE=1 SV=3	0,015530937	0,111201507	0,133441809
Plasma protease C1 inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPING1 PE=1 SV=2	0,0148098	0,106038171	0,127245805
Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1S PE=1 SV=1	0,014567251	0,104301515	0,125161818

Complement factor H-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=CFHR2 PE=1 SV=1	0,013754968	0,09848557	0,118182684
Ig heavy chain V-II region SESS OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	0,013617307	0,097499917	0,1169999
Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens GN=APOB PE=1 SV=2	0,013598923	0,097368289	0,116841947
Ig heavy chain V-III region GA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,012853613	0,092031872	0,110438247
Ig heavy chain V-I region V35 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,012389848	0,088711311	0,106453573
Lumican OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2	0,01157689	0,082890534	0,09946864
Mannose-binding protein C OS=Homo sapiens GN=MBL2 PE=1 SV=2	0,011432382	0,081855858	0,09822703
Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1	0,01071217	0,076699137	0,092038965
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=Homo sapiens GN=ITIH3 PE=1 SV=2	0,00953953	0,068303035	0,081963642
Apolipoprotein C-I OS=Homo sapiens GN=APOC1 PE=1 SV=1	0,007903023	0,056585645	0,067902774
Ig lambda chain V-III region SH OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,007754401	0,055521514	0,066625817
Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2	0,006199384	0,044387592	0,05326511
SH3 and PX domain-containing protein 2A OS=Homo sapiens GN=SH3PXD2A PE=1 SV=1	0,006070614	0,043465597	0,052158716
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase OS=Homo sapiens GN=PGLYRP2 PE=1 SV=1	0,005999388	0,042955621	0,051546745
Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS=Homo sapiens GN=PON1 PE=1 SV=3	0,005496785	0,039356979	0,047228375
Pigment epithelium-derived factor OS=Homo sapiens GN=SERPINF1 PE=1 SV=4	0,005334963	0,038198332	0,045837998
CD5 antigen-like OS=Homo sapiens GN=CD5L PE=1 SV=1	0,005270492	0,03773672	0,045284064
Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens GN=APOC3 PE=1 SV=1	0,004998622	0,035790132	0,042948159

Complement factor H-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=CFHR1 PE=1 SV=2	0,004821587	0,034522563	0,041427076
C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens GN=C4BPA PE=1 SV=2	0,004608283	0,032995305	0,039594366
Ig kappa chain V-III region B6 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,004483148	0,032099343	0,038519211
Carboxypeptidase N subunit 2 OS=Homo sapiens GN=CPN2 PE=1 SV=3	0,003521835	0,025216335	0,030259602
PTB domain-containing engulfment adapter protein 1 OS=Homo sapiens GN=GULP1 PE=1 SV=1	0,002610151	0,01868868	0,022426416
Xanthine dehydrogenase/oxidase OS=Homo sapiens GN=XDH PE=1 SV=4	0,001450107	0,010382763	0,012459315
Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit OS=Homo sapiens GN=IGFALS PE=1 SV=1	0,001073772	0,007688205	0,009225846
Extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=ECM1 PE=1 SV=2	0,000653621	0,004679929	0,005615915
Complement C2 OS=Homo sapiens GN=C2 PE=1 SV=2	0,000635473	0,004549988	0,005459986
Plasma kallikrein OS=Homo sapiens GN=KLKB1 PE=1 SV=1	0,000218264	0,001562767	0,001875321

Proteínas detectadas em GF_pl 5			
Proteínas	%	[prot] em ng - sem fluorescência	[prot] em ng - com fluorescência
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	20,40194157	449,6587922	517,1076111
Ig gamma-3 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG3 PE=1 SV=2	10,43323575	229,948516	264,4407934
Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	9,246585903	203,7947533	234,3639663
Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2	6,45278165	142,2193076	163,5522037

Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1	5,738120234	126,46817	145,4383954
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=2 SV=2	5,463076233	120,4062002	138,4671302
Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2	4,559895839	100,5001043	115,5751199
Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	4,033095226	88,88941878	102,2228316
Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1	3,836668451	84,56017266	97,24419856
Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2	3,400078653	74,93773351	86,17839354
Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1	2,159201331	47,58879733	54,72711693
Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1	1,626712943	35,85275327	41,23066626
Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3	1,622739287	35,76517389	41,12994997
Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	1,585787754	34,95076209	40,1933764
Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3	1,324035212	29,18173608	33,55899649
Ig mu heavy chain disease protein OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	1,305180749	28,76618371	33,08111127
Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3	1,159204035	25,54885693	29,38118546
Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	1,008849479	22,23504252	25,57029889
Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,849387651	18,72050383	21,52857941
Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1	0,84552531	18,63537783	21,4306845
Transthyretin OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1	0,758959624	16,72747012	19,23659064
Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGG PE=1 SV=3	0,74769542	16,47920707	18,95108813
Haptoglobin-related protein OS=Homo sapiens GN=HPR PE=1 SV=2	0,745066136	16,42125763	18,88444628
Ig lambda chain V region 4A OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,672845482	14,82951443	17,05394159

Complement factor H OS=Homo sapiens GN=CFH PE=1 SV=4	0,658333604	14,50967262	16,68612352
Ig kappa chain V-III region HIC OS=Homo sapiens PE=2 SV=2	0,651781181	14,36525723	16,52004581
Ig kappa chain V-III region HAH OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	0,651781181	14,36525723	16,52004581
Immunoglobulin J chain OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=4	0,6488421	14,30047989	16,44555188
Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4 PE=1 SV=3	0,435488573	9,598168144	11,03789337
Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=2	0,372594655	8,211986192	9,443784121
Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1	0,31835932	7,016639414	8,069135326
Ig kappa chain V-I region WEA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,279669332	6,163912087	7,0884989
Complement C1q subcomponent subunit C OS=Homo sapiens GN=C1QC PE=1 SV=3	0,256897963	5,6620311	6,511335765
Ig lambda chain V-IV region Hil OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,249626328	5,501764261	6,3270289
Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1	0,245984518	5,421498786	6,234723604
Ig kappa chain V-IV region JI OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,213892959	4,714200812	5,421330934
Ig kappa chain V-II region RPMI 6410 OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,208705621	4,599871881	5,289852663
Ig heavy chain V-III region VH26 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,196963231	4,341069602	4,992230042
Ig kappa chain V-IV region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGKV4-1 PE=4 SV=1	0,194594346	4,288859385	4,932188293
Antithrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	0,19151441	4,220977586	4,854124224
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4 PE=1 SV=4	0,189400745	4,174392418	4,80055128
Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2	0,175735411	3,87320846	4,454189729
Alpha-1-acid glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1	0,162402776	3,579357191	4,11626077
Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2	0,153701427	3,387579448	3,895716365

Ig kappa chain V-I region Walker OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,150248668	3,311480635	3,808202731
Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2	0,130598372	2,878388113	3,31014633
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 OS=Homo sapiens GN=ITIH1 PE=1 SV=3	0,124069188	2,734484911	3,144657647
Ig kappa chain V-II region TEW OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,118571213	2,613309533	3,005305963
Ig kappa chain V-II region Cum OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,116509105	2,567860672	2,953039773
Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2	0,116102693	2,558903347	2,942738849
Ig kappa chain V-II region GM607 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,114517496	2,523965618	2,90256046
Retinol-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=RBP4 PE=1 SV=3	0,108142915	2,383469844	2,740990321
Histidine-rich glycoprotein OS=Homo sapiens GN=HRG PE=1 SV=1	0,103874084	2,289384815	2,632792537
Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1	0,103797586	2,287698799	2,630853618
Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1	0,098513819	2,171244564	2,496931249
Platelet factor 4 OS=Homo sapiens GN=PF4 PE=1 SV=2	0,097972268	2,159308792	2,483205111
Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=1 SV=3	0,096213018	2,120534927	2,438615165
Lumican OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2	0,095025298	2,09435757	2,408511206
Complement C1r subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1R PE=1 SV=2	0,082930991	1,827799051	2,101968908
Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=1	0,077338213	1,704534214	1,960214347
Ig kappa chain V-III region SIE OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,075938299	1,673680102	1,924732118
Ig kappa chain V-III region Ti OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,075938299	1,673680102	1,924732118
Ig kappa chain V-III region CLL OS=Homo sapiens PE=1 SV=2	0,072484632	1,597561291	1,837195485

Ig kappa chain V-I region Lay OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,071819635	1,582904765	1,82034048
Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A OS=Homo sapiens GN=FCGR3A PE=1 SV=2	0,071262035	1,570615256	1,806207545
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITIH2 PE=1 SV=2	0,070521129	1,554285687	1,78742854
Ig kappa chain V-III region POM OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,067485692	1,48738465	1,710492348
Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4	0,067094394	1,478760441	1,700574508
Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B OS=Homo sapiens GN=FCGR3B PE=1 SV=2	0,065370292	1,440761239	1,656875425
Ig kappa chain V-III region VH (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0,060684808	1,337493174	1,53811715
Serum amyloid A-4 protein OS=Homo sapiens GN=SAA4 PE=1 SV=2	0,059498318	1,311342923	1,508044362
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	0,058900606	1,298169348	1,492894751
CD5 antigen-like OS=Homo sapiens GN=CD5L PE=1 SV=1	0,056262141	1,240017588	1,426020226
Complement component C7 OS=Homo sapiens GN=C7 PE=1 SV=2	0,055404608	1,221117566	1,404285201
Ig heavy chain V-III region JON OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,055132465	1,215119535	1,397387466
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	0,052611897	1,159566214	1,333501146
Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1	0,052126906	1,148877002	1,321208553
Ficolin-3 OS=Homo sapiens GN=FCN3 PE=1 SV=2	0,041533461	0,915397473	1,052707094
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	0,039094308	0,861638544	0,990884325
Complement C5 OS=Homo sapiens GN=C5 PE=1 SV=4	0,037566649	0,82796894	0,952164281

Vitamin K-dependent protein S OS=Homo sapiens GN=PROS1 PE=1 SV=1	0,036804741	0,811176486	0,932852959
Complement component C6 OS=Homo sapiens GN=C6 PE=1 SV=3	0,03613537	0,796423555	0,915887088
Ig heavy chain V-III region BUT OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,035738338	0,787672962	0,905823906
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	0,03090246	0,681090215	0,783253747
Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1S PE=1 SV=1	0,030782326	0,678442474	0,780208846
Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2	0,030061261	0,662550192	0,76193272
Complement component C8 beta chain OS=Homo sapiens GN=C8B PE=1 SV=3	0,028236961	0,622342622	0,715694015
Plasminogen OS=Homo sapiens GN=PLG PE=1 SV=2	0,027962717	0,616298293	0,708743037
Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens GN=APOB PE=1 SV=2	0,027274926	0,601139378	0,691310285
Complement component C8 alpha chain OS=Homo sapiens GN=C8A PE=1 SV=2	0,024491194	0,539785911	0,620753798
Complement component C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2	0,023531748	0,51863972	0,596435678
Plasma protease C1 inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPING1 PE=1 SV=2	0,02318551	0,511008636	0,587659932
Ceruloplasmin OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1	0,022145911	0,488095881	0,561310263
Ig heavy chain V-III region GAL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,021353271	0,470626087	0,54122
Pigment epithelium-derived factor OS=Homo sapiens GN=SERPINF1 PE=1 SV=4	0,018226927	0,401721472	0,461979692
Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2	0,018001803	0,396759737	0,456273698
Coagulation factor XIII B chain OS=Homo sapiens GN=F13B PE=1 SV=3	0,01763475	0,388669882	0,446970365

DNA replication licensing factor MCM7 OS=Homo sapiens GN=MCM7 PE=1 SV=4	0,017357275	0,382554346	0,439937498
Mannose-binding protein C OS=Homo sapiens GN=MBL2 PE=1 SV=2	0,015084978	0,332472918	0,382343856
Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=LRG1 PE=1 SV=2	0,014446021	0,318390298	0,366148842
Carboxypeptidase N catalytic chain OS=Homo sapiens GN=CPN1 PE=1 SV=1	0,014318904	0,315588648	0,362926946
Thyroxine-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SERPINA7 PE=1 SV=2	0,013164202	0,290139016	0,333659869
Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2	0,012566034	0,276955382	0,318498689
Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1	0,011543352	0,254415471	0,292577792
Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	0,011517839	0,25385317	0,291931146
Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	0,009571816	0,210962833	0,242607258
Beta-2-glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=APOH PE=1 SV=3	0,006614789	0,145789947	0,167658439
Carboxypeptidase N subunit 2 OS=Homo sapiens GN=CPN2 PE=1 SV=3	0,00588531	0,129712231	0,149169066
Heparin cofactor 2 OS=Homo sapiens GN=SERPIND1 PE=1 SV=3	0,005859725	0,129148347	0,1485206
Properdin OS=Homo sapiens GN=CFP PE=1 SV=2	0,005819975	0,128272241	0,147513077
Apolipoprotein D OS=Homo sapiens GN=APOD PE=1 SV=1	0,005673449	0,125042824	0,143799247
Afamin OS=Homo sapiens GN=AFM PE=1 SV=1	0,005566046	0,12267565	0,141076998
Alpha-1-acid glycoprotein 2 OS=Homo sapiens GN=ORM2 PE=1 SV=2	0,005496332	0,121139161	0,139310035
Complement C2 OS=Homo sapiens GN=C2 PE=1 SV=2	0,005078841	0,111937664	0,128728314
Ig heavy chain V-III region TUR OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	0,002558762	0,056395115	0,064854382

Complement C1q subcomponent subunit A OS=Homo sapiens GN=C1QA PE=1 SV=2	0,002318938	0,051109397	0,058775806
Angiotensinogen OS=Homo sapiens GN=AGT PE=1 SV=1	0,002209918	0,048706585	0,056012573
Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2	0,000607577	0,013390987	0,015399636
Titin OS=Homo sapiens GN=TTN PE=1 SV=4	0,000174595	0,003848079	0,004425291

Concentração total de proteínas em cada amostra		
Amostra	[prot] com detecção de fluorescência	[prot] sem detecção de fluorescência
GF pl_1	1624 ng	974 ng
GF pl_2	1624 ng	974,4 ng
GF pl_4	859,2 ng	716 ng
GF pl_5	2204 ng	2534,6 ng